

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

**ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES EN LA METILACIÓN
DEL ADN EN PROGRESIÓN TUMORAL**

Francisco Javier Carmona Sanz

Madrid, 2013



**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES EN LA METILACIÓN
DEL ADN EN PROGRESIÓN TUMORAL**

**Francisco Javier Carmona Sanz
Licenciado en Biología**

Tesis Doctoral dirigida por el Dr Manel Esteller Badosa

Dr. Manel Esteller Badosa, Doctor en Medicina, director del laboratorio de Epigenética del Cáncer y del Programa de Epigenética y Biología del Cáncer (PEBC) del Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge (IDIBELL) (anteriormente, jefe del laboratorio de Epigenética del Cáncer del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, CNIO), profesor de la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona (previamente, profesor del departamento de Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid, UAM) e investigador ICREA (Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats),

CERTIFICA

que el trabajo titulado “Estudio de las alteraciones en la metilación del ADN en progresión tumoral” que presenta Francisco Javier Carmona Sanz para la obtención del Grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid, ha sido realizado bajo su dirección en el laboratorio de Epigenética del Cáncer del CNIO y del IDIBELL y reúne, a su juicio, la calidad y contenidos suficientes para que sea presentado ante el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, y a los efectos oportunos, expide el presente

certificado en Barcelona a de de 2013.

Dr. Manel Esteller Badosa

Esta tesis doctoral ha sido financiada por el Laboratorio de Epigenética del Cáncer del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), por el Laboratorio de Epigenética del Cáncer del Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge (IDIBELL), y por el Contrato Predoctoral de Formación en Investigación en Salud (PFIS) FI08/00232 otorgado por el Instituto de Salud Carlos III y el Ministerio de Educación y Ciencia de España.

ÍNDICE DE CONTENIDOS	<u>Páginas</u>
AGRADECIMIENTOS	5
Lista de abreviaturas	7
RESUMEN	9
SUMMARY	11
INTRODUCCIÓN	13
1. Epigenética	13
1.1. Perspectiva histórica	13
1.2. Procesos y componentes de la maquinaria epigenética	15
1.2.1. Metilación del ADN	15
1.2.2. Modificación post-translacional de histonas y complejos remodeladores de la cromatina	19
1.2.3. ARNs no codificantes	22
1.3. Interacción entre los componentes de la maquinaria epigenética	23
2. Epigenética y Cáncer	25
2.1. Patrones aberrantes de metilación del ADN	26
2.2. Alteraciones en los perfiles de modificación de histonas y expresión de ARNs no codificantes en cáncer	28
3. Metilación del ADN en metástasis	30
4. Metilación del ADN en clínica: biomarcadores y farmacoepigenética	31
OBJETIVOS	35
MATERIAL Y MÉTODOS	37
1. Líneas celulares y muestras tumorales humanas empleadas	37
1.1. Cultivo de líneas celulares tumorales humanas	37

1.2. Relación de muestras tumorales humanas	37
2. Estudio de la metilación del ADN	37
2.1. Extracción de ADN	37
2.2. Modificación del ADN con bisulfito sódico	40
2.3. Secuenciación genómica de ADN modificado	40
2.4. PCR específica de metilación	40
2.5. Pirosecuenciación	41
2.6. Plataformas de análisis epigenómico	42
2.6.1. <i>GoldenGate Methylation Cancer Panel I</i>	42
2.6.2. <i>Infinium Human Methylation 450K BeadChip</i>	42
2.6.3. Análisis de datos de arrays de metilación	43
3. Análisis de expresión génica	44
3.1. Extracción de ARN	44
3.2. Análisis de bases de datos públicas de expresión génica	45
3.3. Análisis de expresión por RT-PCR y RT-PCR cuantitativa	45
4. Análisis de expresión proteica	46
4.1. Western-blot	46
4.2. Inmunohistoquímica	47
5. Ensayos funcionales <i>in vitro</i>	48
5.1. Tratamiento con fármacos epigenéticos	48
5.2. Transfección con vectores de expresión e interferencia	48
5.3. Ensayos de proliferación celular	50
5.4. Ensayos de formación de colonias	51
5.5. Ensayos de invasión celular	51
6. Experimentos con modelos animales	52
6.1. Crecimiento tumoral subcutáneo	52
6.2. Inyección intravenosa para evaluación del potencial metastásico	52
6.3. Modelo ortotópico de cáncer de cabeza y cuello	52
7. Análisis estadístico	52

RESULTADOS	53
1. Procesos de inactivación epigenética asociados a metástasis	
1.1. Inactivación transcripcional por hipermetilación del ADN en melanoma y cáncer de cabeza y cuello	53
1.2. Silenciamiento transcripcional de CDH11 por hipermetilación de su región promotora	55
1.3. El restablecimiento de la expresión de CDH11 atenúa el fenotipo metastásico	57
1.4. La pérdida de CDH11 en el tumor primario favorece la progresión tumoral	59
1.5. Análisis de metilación de caderna-11 en pacientes de melanoma y cáncer de cabeza y cuello	61
2. Análisis de las alteraciones en la metilación del ADN en la progresión del melanoma cutáneo	
2.1. Dinámica de los patrones de metilación del ADN en la progresión del melanoma	63
2.2. Influencia de los cambios de metilación del ADN en la los perfiles de expresión génica	66
2.3. Implicaciones funcionales de las alteraciones de metilación de ADN en la progresión del melanoma	67
2.4. Biomarcadores del metilación con valor diagnóstico	67
2.5. Validación de los cambios de metilación del ADN asociados a la progresión del melanoma	68
2.6. La metilación del ADN como factor pronóstico	69
DISCUSIÓN	71
1. Aplicación de técnicas epigenómicas en el estudio del cáncer	71
2. Regulación epigenética del fenotipo metastásico	74
3. Patrones de metilación en la progresión del melanoma cutáneo	76
4. Biomarcadores de metilación del ADN en melanoma cutáneo	79

CONCLUSIONES	81
BIBLIOGRAFÍA	83
ANEXO 1. Material suplementario	105
ANEXO 2. Publicaciones relacionadas	111

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, y a mi hermana Rocío

Lista de abreviaturas

3mK4H3: Lisina 4 de la histona H3 trimetilada
3mK9H3: Lisina 9 de la histona H3 trimetilada
A: Adenina
AB: Anticuerpo (Antibody)
AcH3: Histona H3 acetilada
AcH4: Histona H4 acetilada
ADN: Ácido desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic acid)
ARN: Ácido ribonucleico (Ribonucleic acid)
APS: Persulfato de amonio (Ammonium persulfate)
ATCC American Type Culture Collection
AZA: 5-aza-2'-desoxicitidina
C: Citosina
CDH1: E-caderina
CDH11: OB-caderina
ChIP: Inmunoprecipitación de la cromatina (Chromatin Immunoprecipitation)
CRC: Carcinoma colorrectal (Colorectal carcinoma)
DKO: Double knockout
DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium
DNMT: Metiltransferasa del DNA (DNA methyltransferase)
DNMT3L: DNMT3-like
EZH2: Enhancer of zeste homolog 2
FDA: US Food and Drug Administration
Fig: Figura
G: Guanina
GAPDH: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
HAT: Histona acetiltransferasa
HDAC: Histona desacetilasa
HPRT1: hIpxantina fosforibosiltransferasa 1
IVD: DNA metilado in vitro (in vitro methylated DNA)
LSD1: Lysine-Specific Histone Demethylase 1
MBD: Methyl-CpG Binding Domain
MeCP2: Methyl CpG binding protein 2

MgCl₂: Cloruro de magnesio

miR o miARN: MicroARN

mARN: RNA mensajero (messenger RNA)

MSP: PCR específica de metilación (Methylation specific PCR)

NaOH: Hidróxido sódico

p16INK4a: Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A)

p21WAF1: Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (CDKN1A)

pb: Pares de bases

PBS: Buffer Salino de Fosfato (Phosphate Buffered Saline)

PCA: Análisis de componentes principales (Principal component analysis)

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase chain reaction)

PPIA: Peptidilprolil isomerasa A

PTEN: Phosphatase and tensin homolog

Rb: Retinoblastoma

rpm: Revoluciones por minuto

RT-PCR: PCR después de la transcripción reversa (Reverse transcription followed by PCR)

SAM: S-adenosil-L-metionina

shRNA: ARN pequeño de interferencia estable (Small hairpin RNA)

T: Timina

TEMED N,N,N',N'-tetrametiletildiamida

TSA: Tricostatina A

U: Uracilo

UTR: Región no traducida (Untranslated region)

RESUMEN

La metástasis es la característica más devastadora de los procesos neoplásicos, siendo responsable del 90% de las muertes relacionadas con el cáncer. Los estudios dirigidos a caracterizar las alteraciones moleculares que favorecen la difusión de células cancerosas fuera del nicho primario, han identificado una serie de eventos genéticos que contribuyen a la diseminación metastásica. Sin embargo, los procesos de regulación epigenética, alterados en prácticamente todos los tipos tumorales, permanecen poco estudiados en relación con metástasis.

La metilación del ADN tiene una influencia directa sobre la transcripción génica, habiéndose descrito alteraciones en todas las vías de señalización conocidas. Es el proceso epigenético mejor caracterizado, y un gran número de estudios ha definido un catálogo en continua expansión de biomarcadores epigenéticos con potencial aplicación clínica. Perfiles bien definidos de alteraciones epigenéticas se han atribuido a tipos específicos de tumores. Asimismo, firmas basadas en cambios de metilación del ADN en genes concretos, son capaces de predecir la agresividad tumoral, la respuesta a terapia o la recidiva en diversos tipos de cánceres.

En el presente estudio hemos investigado las alteraciones de metilación del ADN en la progresión tumoral, con especial énfasis en la diseminación metastásica. Para lograr esto, se estudiaron tanto en modelos *in vitro* como en muestras clínicas, para conocer la implicación de las alteraciones en la metilación del ADN en el fenotipo metastásico. En una primera aproximación, hemos identificado una molécula de adhesión celular, Cadherina-11 (CDH11), cuya inactivación epigenética en melanoma y cáncer de cabeza y cuello favorece la metástasis. Este estudio subrayó la fiabilidad de las plataformas de metilación del ADN y los modelos *in vitro* empleados para desenmascarar alteraciones epigenéticas clínicamente relevantes.

Para profundizar en los mecanismos que conducen a la adquisición de propiedades malignas, aplicamos un enfoque similar para detectar alteraciones de metilación del ADN que contribuyen a la progresión del melanoma. Con este fin se examinaron cohortes clínicas de melanoma, y los resultados fueron cruzados con los datos de expresión génica para evaluar las implicaciones funcionales de los cambios en la metilación del ADN. Curiosamente, se demostró una gran implicación de la dinámica de metilación del ADN en la delineación del fenotipo maligno a través de la secuencia de progresión tumoral. En las etapas iniciales, la inactivación epigenética produce la

pérdida de adhesión e identidad celular, que son consistentes con resultados obtenidos a partir de estudios de transcriptómica. Posteriormente, en la diseminación metastásica, la hipometilación del ADN provoca la activación aberrante de los procesos inflamatorios e inmunes que también han sido vinculados a la progresión metastásica y a mal pronóstico. Por otra parte, a partir de este estudio se identificó un conjunto de biomarcadores de metilación de ADN, potencialmente transferibles a la clínica para el diagnóstico del melanoma, el seguimiento de la progresión, y la evaluación de la supervivencia de los pacientes de forma independiente a otros factores.

En conjunto, los resultados obtenidos durante esta tesis doctoral ponen de relieve la importancia de los cambios de metilación del ADN para la diseminación metastásica de las células cancerosas, y en particular para la historia natural del melanoma cutáneo.

SUMMARY

Metastasis is the most devastating feature of neoplastic processes, being responsible of 90% of cancer-related deaths. Studies aiming to characterize the molecular alterations favoring the dissemination of cancer cells away from the primary niche, have identified a series of genetic events contributing to metastatic dissemination. However, the epigenetic regulatory layer, disrupted in virtually every tumor type, has remain poorly characterized in relation to metastasis.

DNA methylation has a direct influence on gene transcription, and alterations in all signaling pathways have been reported. It is the best studied epigenetic process, and a plethora of studies have defined a continuously expanding catalogue of epigenetic biomarkers with potential applicability in the clinic. Well defined profiles of epigenetic alterarions have been attributed to specific tumor types; existing DNA methylation-based signatures are able to predict tumor aggressiveness, response to therapy or recurrence in a variety of cancers.

In the present study we sought to investigate DNA methylation alterations in cancer progression, with a special emphasis on metastatic dissemination. To accomplish this, we examined *in vitro* models as well as clinical specimens to investigate the involvement of DNA methlation alterations in the metastatic phenotype. As a result, we identified a cell-adhesion molecule, Cadherin-11 (CDH11), whose epigenetic disruption in primary melanomas and head and neck cancers triggers metastasis. This study underscored the reliability of DNA methylation platforms and *in vitro* models to identify clinically relevant epigenetic alterations.

To further increase our knowledge on the acquisition of malignant properties, we applied a similar approach to screen DNA methylation alterations contributing to melanoma progression and metastasis. To this end, clinical melanoma cohorts were examined, and the results were crossed with gene expression data to gain insights into the functional implications of DNA methylation changes. Interestingly, we found a great involvement of DNA methylation dynamics in shaping the malignant phenotype across sequential steps of tumor progression. At initial stages, epigenetic inactivation induced loss of adhesion and cell fate in cancer cells in agreement with results obtained from transcriptomic-based studies. Further in metastatic dissemination, DNA hypomethylation causes aberrant activation of inflammatory and immune processes which had been also linked to metastatic progression and bad prognosis. Furthermore,

a valuable set of DNA methylation-based biomarkers was extracted from this study, potentially useful for melanoma diagnosis, monitoring of progression, and evaluation of patient survival independently of other factors.

Altogether, the results obtained during this PhD highlight the relevance of DNA methylation changes for the metastatic dissemination of cancer cells, and in particular for the natural history of cutaneous melanoma.

INTRODUCCIÓN

1. Epigenética

1.1 Perspectiva histórica

Entre los años 40 y 60, los estudios desarrollados de forma independiente por investigadores de distintos campos, apuntaban hacia un mecanismo alternativo y reversible de transmisión de información de generación en generación, distinta a los patrones de herencia mendeliana que se conocían. De especial relevancia fueron los de RA Brinck –estudiando la variación de pigmentación en maíz–, B McClintock –investigando en elementos retroransponibles en el genoma del maíz–, y H Crouse –analizando las traslocaciones del cromosoma X en relación a la determinación del sexo (Crouse HV, 1943). El descubrimiento de la impronta cromosómica por ésta última –primero descubierto en el cromosoma X, y posteriormente extendido a otros loci del genoma–, sugirió por primera vez la existencia de un mecanismo alternativo de regulación de la expresión génica. En el modelo de *Sciara* en que trabajaba, observaba que la actividad de ciertos loci quedaba restringida en función de su origen materno o paterno (Crouse HV et al, 1971). Las aportaciones iniciales en la materia provenían de disciplinas científicas apartadas en la época como biología del desarrollo y genética -disciplinas hoy día inseparables. No obstante, todas estas evidencias convergían en afirmar que tanto el mantenimiento de los niveles de expresión génica durante la vida de un organismo, así como la información transmitida entre generaciones, ocurría sin alteración de la secuencia del ADN. Fue Conrad Waddington quien acuñó por primera vez el término de epigenética en 1952 (Waddington CH, 1952). Sus estudios en embriología le llevaron a definir la epigenética como el conjunto de procesos que confluyen en la formación de un organismo adulto. Esta definición, a pesar de ser poco precisa, sentó las bases para que investigadores, pioneros como Hadorn y Goldschmidt, y otros *a posteriori*, llevaran a la expansión de la investigación en este campo (Van Speybroeck L, 2002; Holliday R, 2006; Urnov FD and Wolfe P, 2001).

Los primeros artículos que sugirieron una explicación para el encendido y apagado de la actividad génica se publicaron en los años 70. Los trabajos de Riggs por un lado (Riggs AD, 1975), y Holliday y Pugh por otro (Holliday R, and Pugh JE. 1975), sugirieron cómo los cambios de metilación en el ADN podrían tener efectos directos sobre la expresión diferencial de los genes a lo largo del desarrollo. Según apuntaban,

las enzimas responsables de este proceso –denominadas posteriormente ADN metil transferasas–, reconocerían secuencias concretas, o serían reclutadas por otras proteínas unidas a las secuencias diana; y también serían capaces de reconocer sustratos hemi-metilados, de forma que los cambios fuesen transmisibles a lo largo de sucesivas divisiones mitóticas. Más adelante, con el avance de la biología molecular, se idearon nuevas técnicas de estudio de la metilación del ADN basadas en el uso de enzimas de restricción con especificidad diferencial en función de la metilación del sustrato –HpaII y MspI (Waalwijk C and Flavell RA, 1978). Paralelamente, se descubrió que el análogo de nucleósido 5-azacitidina tenía actividad inhibidora sobre las enzimas ADN metil transferasas (Jones PA and Taylor SM, 1980). La aplicación de estas nuevas estrategias llevó finalmente a demostrar experimentalmente la influencia de la metilación del ADN sobre la actividad génica.

Con la introducción de la técnica de modificación del ADN con bisulfito sódico en 1992 se abrieron nuevas puertas al estudio de la metilación del ADN (Frommer M et al. 1992). Este seminal descubrimiento aceleró la investigación en epigenética. Mediante la combinación de esta técnica con otras como PCR (Herman JG et al, 1996), secuenciación genómica, o plataformas de análisis genómico se ha podido expandir el estudio de la epigenética a gran variedad de campos y contextos, habiéndose llegado a completar *metilomas* –secuenciación de todos los nucleótidos metilados de un genoma– de organismos superiores (Heyn H et al, 2012; Zhang X et al, 2006), e impulsado la secuenciación del epigenoma humano (Jones PA et al, 2008).

El concepto inicialmente descrito por C Waddington en 1952 marcó los inicios, pero la definición ha tenido que ir siendo ampliada conforme se concretaban los procesos y sus implicaciones biológicas. La *epigenética* por tanto se ha definido de forma consensuada como el "área de estudio de aquellos rasgos que se heredan de forma estable, y surgen de cambios en los cromosomas que no resultan en alteración de la secuencia de nucleótidos" (Berger et al, 2008).

1.2 Procesos y componentes de la maquinaria epigenética

Existen cuatro componentes esenciales con una importancia clave en la regulación génica, el desarrollo y la carcinogénesis: la metilación del DNA, las modificaciones de histonas, los micro-ARNs y los complejos remodeladores de la cromatina (Jones & Laird, 1999) (**Figura 1**).

1.2.1 Metilación del ADN

La metilación del ADN consiste en la adición de un grupo metilo a la posición 5' del anillo pirimidínico de las citosinas que van seguidas de guaninas -denominados nucleótidos CpG. Estos dinucleótidos CpG tienden a concentrarse en la región promotora de aproximadamente un 60% de los genes codificantes en humanos, configurando las Islas CpG –regiones entre 200-2.000 bases con una proporción de CG superior al 50%– y en general se encuentran no metilados en tejidos normales, permitiendo la actividad génica cuando los factores de transcripción correspondientes están disponibles. La metilación del ADN es el proceso epigenético estudiado en mayor profundidad, dada la gran disponibilidad de técnicas para estudiarlo y su repercusión directa sobre la actividad génica (Esteller M, 2008).

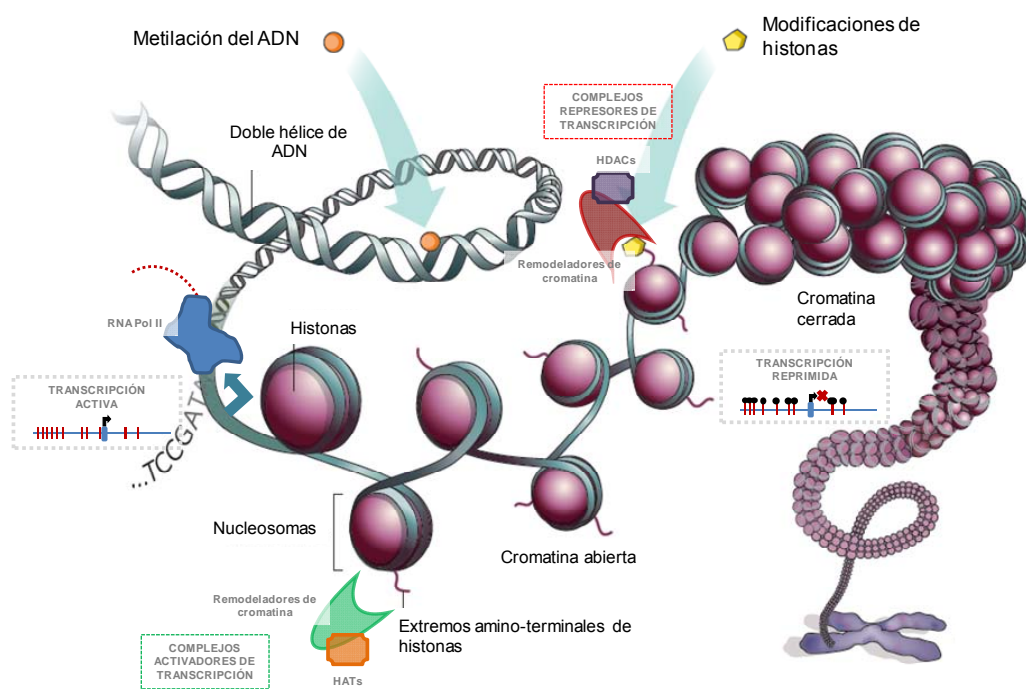


Figura 1: Componentes de la maquinaria epigenética. La cromatina compactada se asocia con silenciamiento transcripcional y está marcada por modificaciones de histonas represivas y metilación del ADN, y se mantiene por acción de complejos multiproteicos. La cromatina abierta presenta marcas de histonas activadoras, ausencia de metilación del ADN en la región promotora y permite el acceso de factores de transcripción. (Adaptado de Marx V, Nature 2012).

Las enzimas responsables de la metilación del ADN son las ADN metil transferasas (DNMTs). Éstas, catalizan la transferencia de un grupo metilo desde la S-adenosil-L-metionina (SAM) hasta la posición 5' del anillo de la citosina. Los componentes principales son las DNMTs-1, 3A y 3B con actividad metilasa y funciones redundantes en determinados contextos, y la DNMT-3L que actúa como cofactor de las anteriores. La DNMT-1 se ha relacionado con metilación de mantenimiento asociado a la replicación del ADN, de manera que se transmitan los mismos patrones a las células

hijas. Las DNMT-3A y 3-B están implicadas en los procesos metilación *de novo*, que tiene lugar durante el desarrollo embrionario (Klose RJ y Bird A, 2006), o en situaciones patológicas en que ocurre de forma aberrante. La DNMT3L (DNMT3-like), carece de actividad metiltransferasa pero está directamente relacionada con la represión epigenética al reclutar enzimas desacetilasas de histonas a promotores metilados (Aapola U et al, 2002; Deplus R et al, 2002). En sentido contrario, estudios publicados en los últimos años han identificado procesos de desmetilación activa del ADN, independiente de la replicación, en distintas etapas de desarrollo y asociados a progresión tumoral. El proceso de desmetilación activa del ADN implica una cadena de reacciones de reparación del ADN catalizadas por la familia de proteínas *ten-eleven translocation* (proteínas Tet) –TET1, TET2 y TET3–, por las que la 5-metil-citosina (5mC) se transforma en 5-hidroximetil-citosina (5hmC) (**Figura 2**) (Tahiliani M et al 2009). La 5hmC se ha asociado a promotores génicos activos, y presenta niveles elevados en células madre embrionarias, que van decayendo conforme aumenta el grado de diferenciación (Globisch D et al, 2010; Koh KF et al, 2011; Szwagierczak A et al, 2010) junto con los niveles de expresión de las proteínas TET.

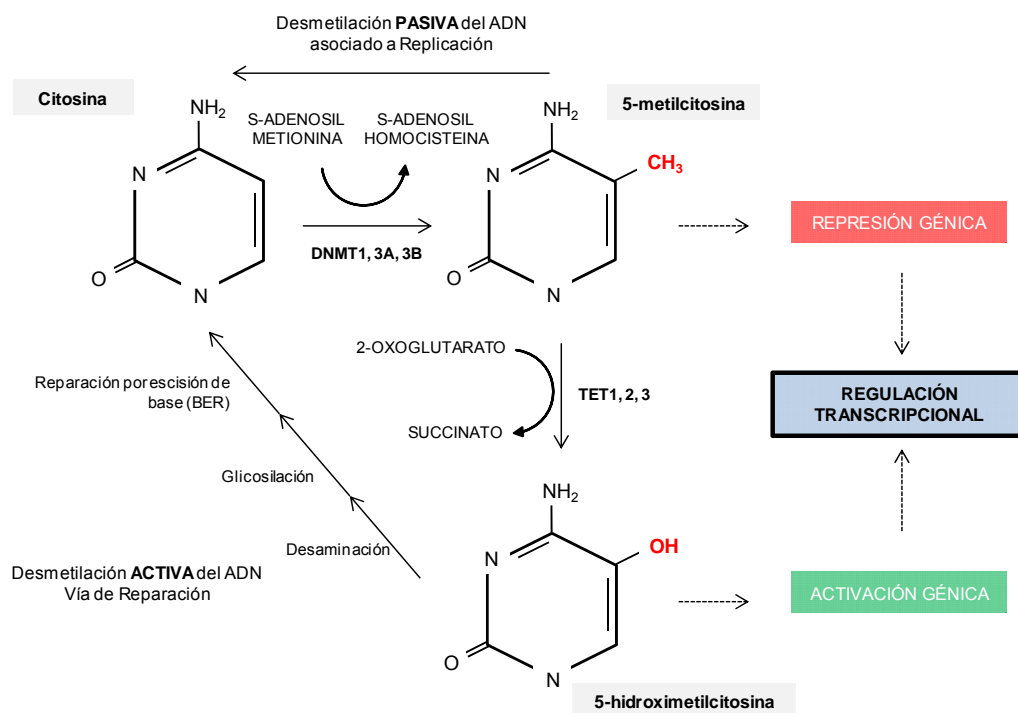


Figura 2: Dinámica de metilación y desmetilación del ADN. Los patrones de metilación son establecidos y mantenidos por las ADN metiltransferasas (DNMTs). La desmetilación del ADN puede ser un proceso pasivo asociado a replicación del ADN, o activo mediado por las proteínas TET. Éstas tienen la capacidad de oxidar la 5-metilcitosina (5mC) a 5-hidroximetilcitosina (5hmC). La 5hmC se puede convertir posteriormente en citosina tras una cadena de reacciones enzimáticas relacionadas con la vía de reparación de ADN por escisión de base.

Conforme se comprometen los programas transcripcionales en linajes celulares específicos, los niveles de TET disminuyen, y descienden los niveles de 5hmC en los promotores de estos genes que son silenciados por enzimas metil-transferasas de histonas y complejos Polycomb. Paralelo a la represión de los genes de pluripotencia y restricción de los linajes celulares, hay programas transcripcionales específicos que requieren ser activados. En este respecto, se ha observado hipometilación activa independiente de replicación, del gen de la α -actina en mioblastos (Paroush Z et al, 1990), o de *Bdnf IX* y *Fgf1B* en cerebro adulto (Guo JU et al, 2011), coincidiendo con su activación transcripcional.

La metilación del ADN es un proceso normal e imprescindible que ocurre en todos los organismos, desde bacterias hasta plantas y animales, desempeñando funciones de coordinación transcripcional, replicación y reparación del ADN, tanto en organismos adultos como en desarrollo. No obstante, hay gran variabilidad en los patrones de metilación del ADN a lo largo de la escala filogenética. Se ha observado que en bacterias y hongos, la metilación del ADN desempeña una función protectora contra genomas externos invasores. De forma similar, en plantas y mamíferos, las secuencias endorretrovirales, elementos transponibles (LINEs, SINEs) etc, integrados en el genoma hospedador tras siglos de evolución, son hipermetiladas por la maquinaria celular para reprimir su expresión (Pablo D et al, 2003).

En eucariotas, la metilación del ADN es necesaria para el silenciamiento permanente de determinados loci –genes imprintados– y cromosomas –inactivación del cromosoma X en hembras. También es necesaria para coordinar programas transcripcionales en procesos de desarrollo y diferenciación (Reik W et al, 2001). En el organismo adulto, la metilación del ADN determina patrones de transcripción tejido-específicos que confieren "identidad celular": si el código genético individualiza biológicamente a un organismo frente a los demás, los procesos epigenéticos confieren identidad propia -o fenotipo- a cada tipo celular dentro de un mismo organismo. La distribución de 5-metil citosina en el genoma sigue un patrón bimodal, según el cual los dinucleótidos CpG incluidos en islas CpG se carecen de metilación, mientras que los que se encuentran fuera, están metilados (**Figura 3**). Esto se correlaciona con la actividad transcripcional de los promotores asociados: las islas CpG están asociadas a promotores de genes muy activos y evolutivamente conservados, mientras que promotores no asociados a islas CpG presentan niveles de transcripción más bajos y presentan más variabilidad evolutiva (Bell O et al, 2011; Fernandez AF et al, 2012; Elango N y Yi SV, 2008)

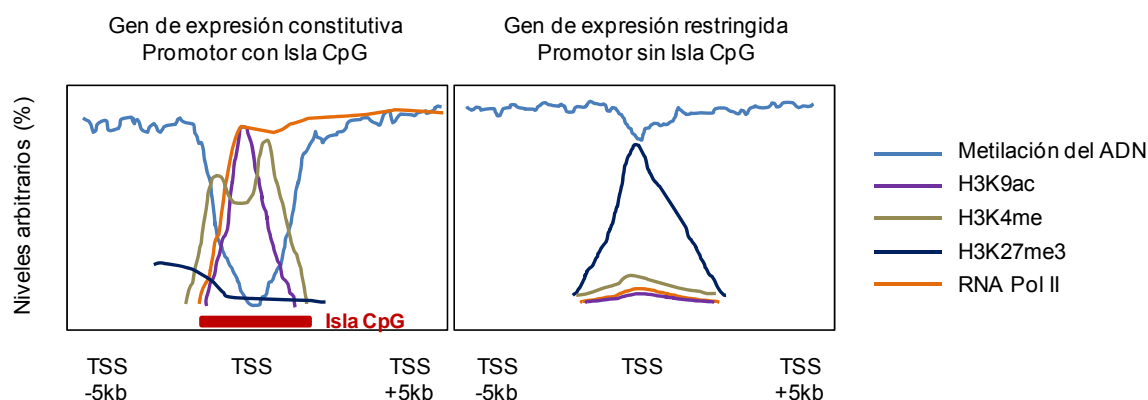


Figura 3: Perfiles de metilación y modificaciones de histonas en promotores génicos. En células somáticas, los genes de expresión constitutiva suelen presentar una isla CpG en su región promotora en estado no metilado y con presencia modificaciones de histonas (H3K9ac, H3K4me) asociadas a activación transcripcional. Los genes cuya transcripción se restringe a determinados tejidos o tipos celulares, no suelen estar asociados con islas CpG, y el ADN se encuentra metilado y asociado a marcas de histonas represoras (H3K9ac, acetilación de lisina 9 en histona 3; H3K4me, metilación de lisina 4 en histona 3; H3K27me3, trimetilación de lisina 27 en histona 3) restringiendo el acceso de la maquinaria de transcripción.

Así como la metilación en la región promotora de los genes codificantes se viene estudiando desde hace décadas, y su implicación en la regulación transcripcional ha sido caracterizada, la función de la metilación presente en el ADN del cuerpo de los genes ha sido poco investigada. Una de las hipótesis propuestas fue la de que la metilación intragénica estaría asociada a la represión de transposones localizados en intrones, o de promotores génicos secundarios que quedarían silenciados. Estudios recientes han observado una correlación positiva entre metilación del ADN del cuerpo del gen y expresión génica, tanto en plantas como animales (Feng S et al, 2010; Ball MP et al, 2009; Hellman A y Chess A, 2007; Rauch TA et al, 2009). Mientras que la hipermetilación del ADN en regiones promotoras reprime la iniciación de la transcripción, ésta parece ejercer un efecto sinérgico sobre su elongación (Jones PA, 1999; Jjingo D et al, 2012), por lo que los cambios de metilación en el cuerpo del gen modularían el grado en que un gen es expresado. En este sentido, se ha encontrado asociación entre la hipermetilación de islas CpG fuera de promotores, y la activación tejido-específica de ciertos genes (Straussman R et al, 2009). En leucemia mieloide crónica, se han descrito cambios en la metilación intragénica con correlación positiva y negativa con la expresión de los genes afectados, sugiriendo que en función de la zona, ésta puede ejercer distintos efectos (Kulis M et al, 2012). No obstante, el esclarecimiento del papel de la metilación en regiones intragénicas, su relación con la regulación mediada por la metilación diferencial del promotor, y su efecto sobre la transcripción génica, son cuestiones que quedan por esclarecer.

1.2.2 Modificación post-translacional de histonas y los complejos remodeladores de la cromatina

Las histonas son proteínas altamente conservadas a lo largo de la evolución, esenciales para el empaquetamiento del ADN en el núcleo eucariótico. Las histonas (H2A, H2B, H3 and H4) conforman un octámero entorno al que se pliega el ADN (146 pb), constituyendo los nucleosomas. No obstante, lejos de desempeñar una función meramente estructural como proteínas empaquetadoras del ADN, los cambios post-traduccionales que se dan en las histonas tienen repercusión directa sobre la conformación de la cromatina, y participan en procesos de reparación del ADN, actividad transcripcional, y replicación, entre otros (**Figura 4**). Estos cambios se dan principalmente en las colas amino-terminales que protruyen del octámero, pudiendo también modificarse algunos residuos localizados en el núcleo globular, y su naturaleza y repercusión funcional es tan variada que se postuló la existencia de un código de histonas (Strahl BD y Allis CD, 2000).

Las modificaciones más estudiadas que se dan en histonas son la acetilación, metilación de lisinas y argininas, y fosforilación de serinas. No obstante, hay otras modificaciones como ubiquitinación, sumolación, ribosilación o isomerización de prolinas que se investigan en relación a su influencia en la dinámica de la cromatina y a su efecto sobre la transcripción. En general, las enzimas que llevan a cabo estas modificaciones son parte de complejos multiproteicos implicados en regulación de la transcripción u otros procesos genómicos. Asimismo, cada una de estas modificaciones son resultado del balance entre las enzimas que las adicionan, y las que las eliminan (Bannister AJ y Kouzarides T, 2011; Kouzarides T, 2007), y desempeñan funciones que afectan directamente a la configuración de la cromatina, o bien constituyen señales que son reconocidas por otros complejos.

La acetilación de histonas la llevan a cabo enzimas acetil transferasas (HATs), mientras que su desacetilación resulta de la actividad de enzimas desacetilasas (HDACs). Las HATs comprenden tres familias –GNAT, MYST y CBP/p300–, y se asocian en complejos multiproteicos para acetilar lisinas, localizadas en distintas posiciones de las colas amino-terminales de las ocho proteínas histonas. Antagónicamente, las HDACs se clasifican en tres familias –HDA1, Hos3 y sirtuinas–, y se encargan de la eliminación de los grupos acetilos. De forma equivalente, la metilación resulta del balance entre enzimas metil transferasas (HMTs) de histonas, y demetilasas (HDMTs), y de igual modo para el resto de modificaciones descritas. La combinación de estas modificaciones –según el aminoácido en que se den, el número

de modificaciones por residuo, y sus sinergias o incompatibilidades– condicionan la interacción con los complejos proteicos efectores de los que depende la actividad transcripcional de los genes afectados (Sterner DE y Berger SL, 2000; Sanchez-Mut JV, et al, 2012)

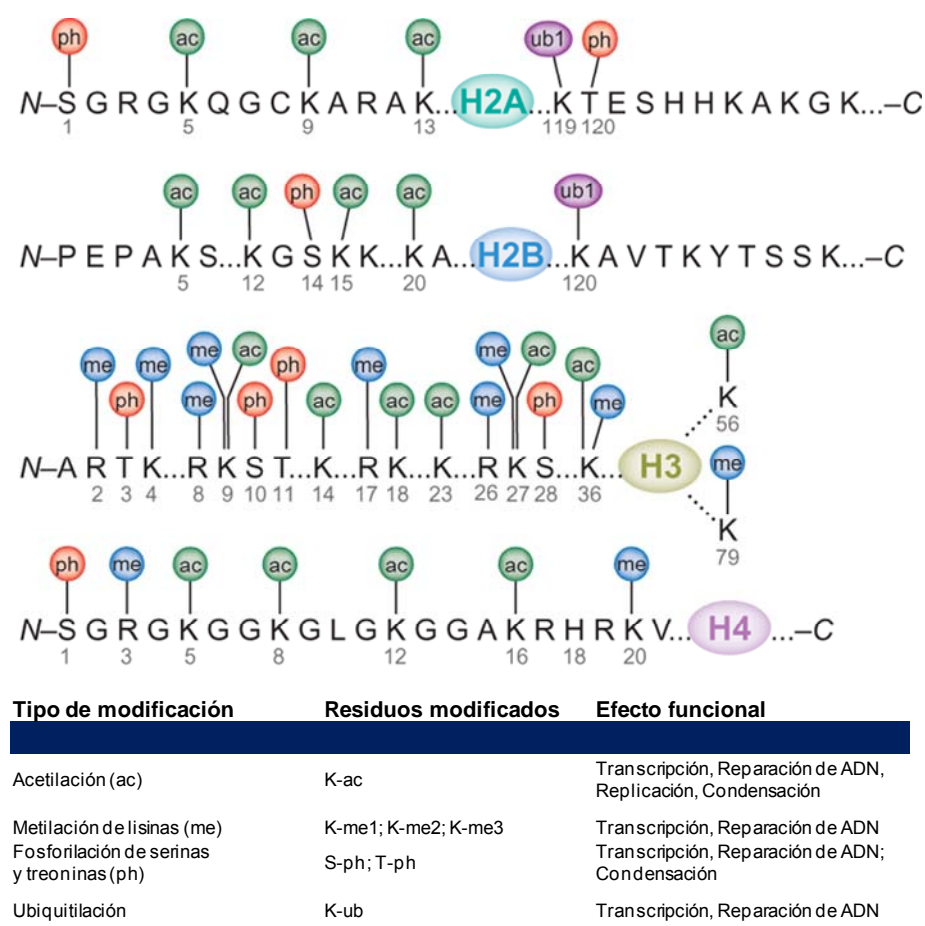


Figura 4: Esquema de modificaciones post-transcripcionales en histonas. Las modificaciones que tienen lugar, principalmente, en los extremos amino-terminales de las histonas constituyen elementos de reconocimiento para complejos multiproteicos implicados en diversos procesos, y para elementos reguladores de la actividad transcripcional. En función de los residuos modificados, de la cantidad y tipo de modificación, y del complejo/s que interaccionen con dichas modificaciones, los efectos funcionales afectan a multitud de procesos biológicos. (ph, fosforilación; ac, acetilación, ub, ubiquitinación; me, metilación).

En general, la acetilación de lisinas se correlaciona con activación transcripcional, debido a su efecto en las interacciones electrostáticas entre histonas y ADN, mientras que el proceso contrario se asocia con silenciamiento. La metilación de histonas afecta a lisinas –que pueden estar mono-, di- o trimetiladas– y argininas –sujetas a mono- y dimetilación simétrica o asimétrica. Esta marca está asociado tanto a activación como a represión transcripcional. La trimetilación (me3) de la lisina (K) 9 de la histona H3

(H3K9me3), y la di- y trimetilación de H3K27, se asocian con dominios de heterocromatina transcripcionalmente inactivos. Por otro lado, la trimetilación de H3K4 y H3K36, así como la metilación de argininas (R) en posición H4R3 y H3R2, se asocian con promotores transcripcionalmente activos. A su vez, la fosforilación de la serina 10 de la histona H4 (H4S10P), en combinación con acetilación de H4K16 promueve la unión del complejo remodelador de la cromatina BRD4 que a su vez estimula la elongación de la RNA PolI (Kouzarides T, 2002; Wysocka J et al, 2006; Zippo A et al, 2009).

El compartimento génico en que ocurre la modificación es otro factor determinante en su significado funcional. Así, hay ciertas modificaciones asociadas con región promotora, inicios de transcripción canónicos o alternativos, *enhancer*, etc. que modulan su actividad, mientras que otras se asocian con límites intrón-exón o cuerpo génico, y se relacionan con *splicing* alternativo o elongación de la transcripción. Las mono- y trimetilación de la lisina 4 de la histona 3 (H3K4me, H3K4me3) se localizan en inicios de transcripción y *enhancers* de genes activos (Heintzman et al 2007), constituyendo indicadores de acceso para la maquinaria de transcripción; la marca H3K79me2 indica presencia de intrones; mientras que la H3K36me3 se encuentra en los exones a lo largo del cuerpo génico, y favorece la elongación de la RNA polimerasa II y con ello la transcripción génica (Hon G et al, 2009; Hahn MA et al, 2011; Bannister AJ and Kouzarides T, 2011).

Los complejos remodeladores de la cromatina son una familia de complejos multiproteicos que cambian la configuración de la cromatina regulando la distribución y composición de los nucleosomas, y la disposición del ADN sobre los mismos. Se compone de cinco miembros, todos ellos con un dominio ATP-asa común necesario para obtener la energía desprendida por hidrólisis de ATP. A través de la relajación o compactación de la cromatina, estos complejos regulan procesos de transcripción, replicación, reparación o recombinación del ADN (Clapier CR y Cairns BR, 2009). El reconocimiento de los nucleosomas se produce por interacción entre dominios específicos de los complejos remodeladores con marcas concretas en las histonas del nucleosoma. El mecanismo por el cual los complejos remodeladores son capaces de influir en la dinámica nucleosomal, pasa por una interacción directa con el nucleosoma, y la traslocación del ADN mediante la interrupción de los contactos histona-nucleosoma. En función de la amplitud del lazo (1-100 pb) y de la actividad del complejo remodelador, el nucleosoma se desplazará a lo largo de la doble hélice, se creará el espacio suficiente para permitir el intercambio de histonas, o se producirá la

eyección del nucleosoma y la consiguiente descompactación de la cromatina (Clapier CR y Cairns BR, 2009; Strohner R et al, 2005; Zhang Y et al, 2006) .

El efecto de los complejos remodeladores sobre la expresión génica está bastante restringido a familias de remodeladores. Así, la familia SWI/SNF –BAF, PBAF– está principalmente asociada a relajación de la cromatina, mientras que los miembros de ISWI actúan tanto compactando la cromatina y reprimiendo la transcripción –CHRAC, ACF–, como espaciando los nucleosomas –NURF– y facilitando el acceso de la RNA Polimerasa II (RNA Pol II) (Polo SE y Almouzni G, 2006).

1.2.3 ARNs no codificantes

El descubrimiento de los micro-ARNs (miRs) abrió la veda en investigación en lo que hasta entonces se consideraba el genoma oscuro o no-codificante, y que comprende el 90% del genoma. Los miRs se definieron como moléculas de unos 22 bases que actúan como reguladores de la expresión génica en eucariotas (He LY y Hannon GJ, 2004).

Los miRs se agrupan en familias según su homología de secuencia, especialmente en el extremo 5' del miRNA maduro (Esquela-Kerscher A y Slack FJ, 2006). Hay dos tipos de miRs según su localización genómica: los miRs intergénicos, localizados en regiones no codificantes, y los intragénicos. Los primeros no están asociados a ningún gen y son transcritos por la RNA Pol II a partir de su propio promotor. Los miRs intragénicos pueden ser exónicos o intrónicos, y su transcripción depende de la del gen en el que se encuentran insertados. Seguido a su transcripción, los pre-miRs transcritos han de ser procesados por las enzimas Drosha y Dicer, con actividad RNasa, y finalmente transportados al citoplasma donde principalmente desarrollan su función.

Los miRNAs tienen una función bloqueadora sobre la expresión de sus genes diana, que se basa en la complementariedad entre el miR y la región 3' no traducida (3'UTR) del mRNA (ARN mensajero), dando lugar a la inhibición de la traducción o la degradación del mRNA (Bartel DP y Chen CZ, 2004). Mediante este mecanismo, los miRs controlan cientos de genes implicados en gran variedad de procesos celulares y vías de señalización (Bartel DP, 2009).

Tras el descubrimiento de los miRs se han venido caracterizando muchas otras clases de ARNs no codificantes (Esteller M, 2012; Li L, Liu Y, 2011; Lujambio A Lowe SW, 2012). Éstos varían en su longitud: *PIWI-interacting RNAs* (piARNs, 24–30 bases), *small nucleolar RNAs* (snoARNs, 60–300 bases), y *large intergenic non-coding RNAs*

(lincARNs, > 200 bases), entre otros. Las funciones que desempeñan y su regulación transcripcional comienza a ser elucidada. Notablemente, los lncRNAs se han visto implicados en procesos de regulación epigenética mediante el reclutamiento de complejos remodeladores de la cromatina a loci específicos. La clasificación de todos los nc-ARNs que van surgiendo es complicada dada la gran diversidad estructural, la variedad de procesos en que están implicados, y las vías independientes de procesamiento y regulación (Esteller M, 2012; Li L, Liu Y, 2011; Lujambio A y Lowe SW, 2012).

1.3 Interacción entre los componentes de la maquinaria epigenética

Los distintos procesos epigenéticos funcionan de forma coordinada para regular de forma precisa la expresión del genoma (**Figura 5**). Los estudios en el borrado y restablecimiento de los patrones epigenéticos en el embrión han permitido descubrir un ejemplo de esta relación. Los patrones de metilación del ADN se establecen durante el desarrollo embrionario. En concreto, durante el desarrollo preimplantacional se produce una onda de desmetilación del ADN y una reorganización de las marcas de histonas. Este "formateado" del epigenoma va seguido de una metilación *de novo* del ADN que se produce después de la implantación del embrión, y que determina el patrón epigenético del nuevo individuo. Esta reprogramación epigenética determina la pluripotencia celular, los patrones de expresión génica y las fases de desarrollo temprano de los linajes celulares en el embrión, (Reik W et al, 2001; Morgan HD et al, 2005). Estudios recientes apuntan a que los patrones de metilación de la lisina 4 de la histona H3 (H3K4me) se establecen antes de que se produzca la metilación *de novo* del ADN y se dan preferencialmente en islas CpG –dirigido por tanto por la secuencia del ADN. Esta modificación recluta a su vez enzimas metil transferasas de H3K4, que marcan los nucleosomas asociados a islas CpG, mientras que el resto del genoma permanecería con H3K4 no metilada. A continuación, las DNMTs 3A y 3B encargadas de la metilación *de novo* del ADN, forman complejos con la DNMT-3L –cofactor sin actividad metilasa– que permite la interacción con la histona H3 de los nucleosomas. No obstante, la metilación de H3K4 inhibe la interacción de DNMT3L con los nucleosomas. En consecuencia, las islas CpG, enriquecidas en H3K4me –entre ellas, las asociadas a los genes *Oct4*, *Nanog*, *Sox2* de pluripotencia– quedan protegidas de la actividad metilasa, mientras que el resto de CpGs en el genoma quedarían metilados (Ooi S et al, 2007; Guenther MG et al, 2007; Jia D et al, 2007). Curiosamente, se ha observado que la gran mayoría de islas CpG del genoma marcadas con H3K4me se asocian con inicios de transcripción y con posicionamiento de la RNA Pol II, por lo que la protección frente a la ola de metilación *de novo* del ADN

permitiría la transcripción de estas regiones. También se ha asociado el mantenimiento de los genes de pluripotencia en estado activo con una presencia predominante de 5hmC asociada a la alta expresión de proteínas TET en desarrollo embrionario. Es en este momento en que se establece el patrón bimodal de metilación del ADN que se conserva a lo largo de sucesivas divisiones celulares: (1) las islas CpG asociadas a H3K4me permanecen no metiladas, mientras que (2) la mayor parte de regiones del ADN no asociadas a islas CpG pasan a ser metiladas (Costa Y et al, 2013; Cedar H y Bergman Y, 2012).

Conforme aumenta el grado de diferenciación, los genes de pluripotencia son progresivamente inactivados mediante el reclutamiento de enzimas metil-transferasas de histonas, proteínas Polycomb y la maquinaria de metilación del ADN (DNMTs). Por un lado, los promotores a partir de los cuales se transcriben son susceptibles de ser inactivados por hipermetilación del ADN o adición de marcas represivas en las histonas como ocurre en muchos procesos patológicos. Por otro, se han descubierto nc-RNAs que dirigen cambios en la conformación de la cromatina, y por tanto en la actividad génica. El lincRNA *HOTAIR*, transcrito a partir del locus de *HOXC*, interacciona de manera simultánea con los complejos PRC2 (polycomb repressive complex 2) a través de su extremo 5', y por el extremo 3' con el complejo represor CoREST/REST (Lunyak VV et al., 2002; Gupta RA et al, 2010; Rinn JL et al., 2007). La interacción de los complejos modificadores de histonas con el lincRNA *HOTAIR* posibilita la represión transcripcional de los genes diana, y sugiere funciones adicionales y relaciones aún no descritas entre los distintos reguladores epigenéticos. Los genes de desarrollo quedan así reprimidos y comienzan a establecerse los patrones de metilación característicos de cada linaje celular que determinarán los patrones de expresión específicos de tejido.

Hay también una estrecha coordinación en el establecimiento de modificaciones de histonas. Éstas son agregadas o eliminadas por complejos multiproteicos con dominios de reconocimientos específicos. El "diálogo" entre las distintas marcas de histonas está mediado por la presencia de dominios de reconocimiento de estas marcas, en complejos modificadores de histonas. Esto posibilita que ciertas modificaciones actúen sinérgicamente o inhiban la adición de otras marcas. Las marcas de histonas son también reconocidas por dominios presentes en complejos remodeladores de la cromatina, que a su vez modulan la dinámica nucleosomal en respuesta a la combinación de modificaciones presentes en las colas de las histonas. (Raisner RM et al, 2005; Wysocka J et al, 2006; Clapier CR y Cairns BR, 2009).

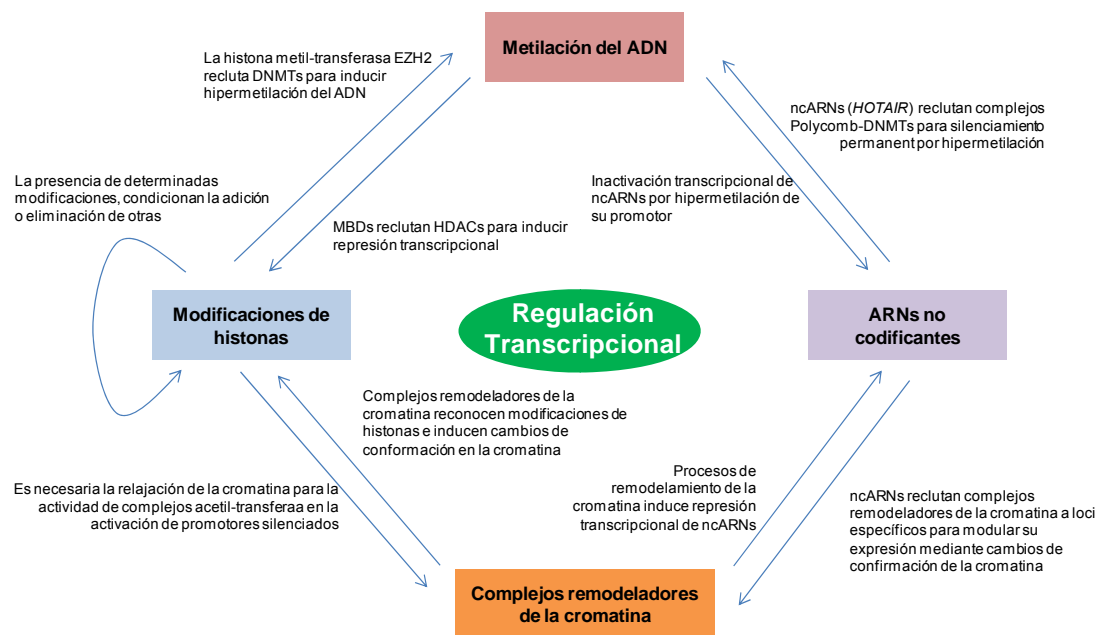


Figura 5: Interacción entre los distintos componentes de la maquinaria epigenética. La regulación transcripcional está estrechamente controlada mediante la coordinación de los componentes de la maquinaria epigenética celular. Todos ellos interaccionan entre sí para determinar la correcta actividad génica en distintos tipos celulares y etapas del desarrollo.

Los patrones transcripcionales que se establecen en la célula siguen una estrecha regulación espacio-temporal que resulta de la coordinación de los componentes de la maquinaria epigenética. La complejidad inherente a la cantidad de elementos integrantes, hace que la epigenética en su conjunto sea un área de investigación en plena expansión, necesaria para entender tanto los mecanismos que dirigen el desarrollo de un organismo como las alteraciones que desencadenan procesos patológicos.

2. Epigenética y cáncer

La alteración de los patrones epigenéticos normales está considerada como una característica intrínseca del desarrollo tumoral que se ha observado en todos los tipos tumorales estudiados, y afecta prácticamente a todas las rutas de señalización celular. Los patrones anormales de modificación de histonas son un rasgo común en cáncer. Éstos surgen en estadios tempranos y se acumulan a lo largo de la progresión, considerándose factor informativo de pronóstico de la enfermedad. Los perfiles aberrantes de expresión de los ARNs no codificantes (nc-ARNs) también se han identificado en cáncer, desempeñando un papel crucial en el fenotipo tumoral dada su

función como reguladores de la expresión génica. Finalmente, los cambios en los patrones de metilación del ADN se han venido estudiando en mayor profundidad dada su importancia en los procesos homeostáticos de las células sanas y la gran repercusión que su alteración tiene en el origen y la progresión tumoral.

2.1 Patrones aberrantes de metilación del ADN

La inactivación génica como resultado de la metilación aberrante de los promotores génicos, recapitula el efecto represivo de mutaciones o deleciones induciendo el silenciamiento transcripcional de los genes alterados, y tiene consecuencias cruciales cuando los promotores hipermetilados dirigen la expresión de genes supresores tumorales. El descubrimiento del silenciamiento epigenético como mecanismo extendido de inactivación génica, requirió que la hipótesis de Knudson –son necesarias dos mutaciones, *two hits*, para la inactivación de un gen: una recesiva heredada de los progenitores y otra adquirida independientemente durante los primeros años de vida– fuese reformulada para incluir la inactivación epigenética como *second hit* (Garinis GA et al, 2002; Esteller M, 2008)

En cáncer, las lesiones precursoras de tumores presentan ya alteraciones de la expresión debidas a cambios en los perfiles epigenéticos (**Figura 6**), antes incluso de exhibir cambios fenotípicos apreciables. En cáncer humano los patrones de metilación del ADN cambian drásticamente generando una reprogramación del epigenoma y alterando los patrones de expresión. Por un lado se produce la hipermetilación de genes supresores tumorales, y por otro se da una ola de hipometilación global del ADN que afecta a secuencias repetitivas en dominios de heterocromatina, y elementos transponibles y retrovirales integrados en el genoma (Esteller M, 2008; Jones PA, 2012). Estos cambios estimulan, no solo la transformación y desarrollo temprano de neoplasia, sino que se acumulan y fomentan la progresión y metástasis de las células tumorales.

La hipometilación del ADN en cáncer frente a sus tejidos normales fue la primera alteración epigenética identificada en cáncer (Feinberg AP y Vogelstein B, 1983). Esta pérdida global de metilación se observa en etapas iniciales, e incrementa en paralelo al desarrollo del tumor (**Figura 6**). Los efectos funcionales son principalmente tres: (1) reactivación de elementos transponibles: secuencias LINE1 y Alu, hipermetiladas en fases embrionarias, se hipometilan y correlacionan con mal pronóstico en diversos tipos tumorales; (2) inestabilidad genómica por incremento de la tasa de mutaciones; y (3) pérdida de *imprinting*: alteración en la metilación del loci imprintado *IGF2* es factor de riesgo en cáncer de colon (Richard Z et al, 1998; Cui H et al, 2003; Kaneda A y

Feinberg AP, 2005). Recientes estudios apuntan a que la hipometilación del ADN puede estar también asociada silenciamiento génico debido a la formación de dominios de cromatina enriquecidos en marcas de histonas represoras como H3K9me3/H3K27me3 (Hon GC et al, 2012).

La inactivación aberrante de genes supresores tumorales por hipermetilación de sus promotores, contribuye al fenotipo tumoral a todos los niveles, ya que afecta a todos los procesos que se desregulan en cáncer, incluyendo proliferación celular, adhesión, diferenciación y control de ciclo celular, entre otros (**Tabla 1**) (Hanahan D y Weinberg RA, 2000; Esteller, 2008). El gen supresor tumoral retinoblastoma (*Rb*) fue el primer caso descubierto de inactivación génica por hipermetilación del promotor. Desde entonces, numerosos estudios han identificado hipermetilación de otros genes supresores tumorales clásicos como *p16*, *MGMT*, *BRCA1*, *hMLH1* en un amplio panel de tipos tumorales (**Tabla 1**). La caracterización de los patrones de metilación en genes candidatos permitió incluso establecer una firma de metilación del ADN que distinguía tipos tumorales (Esteller et al, 2001; Costello JF et al, 2000; Paz MF et al, 2003), y que ha sido ampliada en estudios posteriores con el uso de técnicas de análisis genómico (Fernandez AF et al, 2012).

Tipo tumoral	Nombre del gen	Compartimento celular/Proceso afectado	Frecuencia de metilación	Localización genómica
Cáncer Colorrectal				
<i>hMLH1</i>	mutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2	Núcleo/Reparación del ADN	77% MSI-H CRC	3p21.3
<i>RASSF1A</i>	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1	Citosol/Ciclo celular	45% CCR	3p21.3
<i>DAPK</i>	Death-associated protein kinase	Citosol/Apoptosis	20-25% AD, 83% CCR	9q34.1
<i>TMEFF2/HPP1</i>	transmembrane protein with EGF-like and two follistatin-like domains 2	Proteínas de membrana/Proliferación celular	63% HP, 66% AD, 84% CCR	2q32.3
<i>SFRP-2</i>	secreted frizzled-related protein 2	Proteínas de secreción/vía Wnt	83-90% CCR	4q31.3
<i>DKK-1</i>	dickkopf homolog 1	Proteínas de secreción/vía Wnt	13% CCR	10q11.2
<i>GATA-4/-5</i>	GATA binding protein 4/5	Factores de transcripción	70% and 79% CCR	8p23.1-p2/20q13.33
<i>p14</i>	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A	Proteína nuclear/Ciclo celular	38% CCR	9p21
<i>p16</i>	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A	Proteína nuclear/Ciclo celular	32% CCR	9p21
<i>COX-2</i>	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	Citoquinas/Inflamación	14% AD	1q25.2
Cáncer de Mama				
<i>CDH13</i>	H-Cadherin	Membrana celular/Adhesión celular	33% tumores primarios	16q23.3
<i>RARβ-2</i>	retinoic acid receptor, beta	Receptor nuclear/Señalización celular	31% tumores primarios	3p24
<i>ESR1</i>	estrogen receptor 1	Receptor nuclear/Proliferación celular	46% tumores primarios	6q25.1
<i>BRCA1</i>	breast cancer 1, early onset	Proteína nuclear/Reparación de ADN	18% tumores primarios	17q21
<i>HIC1</i>	hypermethylated in cancer 1	Factor transcripcional/Proliferación celular	48% tumores primarios	17p13.3
<i>SFRP2</i>	secreted frizzled-related protein 2	Proteínas de secreción/vía Wnt	83% tumores primarios	4q31.3
Cáncer de Próstata				
<i>GSTP1</i>	glutathione S-transferase	Citosol/Apoptosis	80-95% AD	20q13.2
<i>LAMA5</i>	laminin, alpha 5	Proteína de secreción/Matriz migración y remodelamiento de la matriz extracelular	18-45% tumor primario	20q13.33
<i>RASSF1A</i>	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1	Núcleo-Citosol/Apoptosis y ciclo celular	>70% tumor primario	3p21.3
<i>uPA</i>	urokinase plasminogen activator	Citosol/Proliferación celular, migración y remodelamiento de la matriz extracelular	96% hipometilación en tumor primario	10q24
Cáncer de Pulmón				
<i>SEM A3B</i>	semaphorin 3B	Proteína de secreción/Apoptosis	41% NSCLC	3p21.3
<i>IGFBP3</i>	insulin-like growth factor binding protein 3	Proteína nuclear/Supervivencia celular	60% NSCLC	7p14
<i>PAX5</i>	paired box homeotic gene 5	Factor de transcripción/Diferenciación	40-50% AD y SCC	9p13
<i>p16</i>	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A	Proteína nuclear/Ciclo celular	25-30% NSCLC	9p21
<i>RARβ-2</i>	retinoic acid receptor, beta	Receptor nuclear/Señalización celular	40% NSCLC	3p24

AD: Adenocarcinoma; HP: pólipos hiperplásicos; CCR: cáncer colorrectal; MSI: inestabilidad de microsatélites; NSCLC: cáncer de pulmón de célula no-pequeña; SCC: carcinoma de células escamosas.

Tabla 1: Genes frecuentemente inactivados en cáncer por hipermetilación aberrante de su promotor.

Se ha observado que hay más genes que sufren inactivación por mecanismos epigenéticos que por alteraciones genéticas (Herman y Baylin, 2003). A diferencia de las mutaciones genéticas, de carácter irreversible, las *epimutaciones* son potencialmente reversibles. En el proceso de metástasis, las alteraciones en metilación del ADN descritas son más escasas. Esto se debe a que la investigación se ha centrado al estudio de etapas iniciales de formación tumoral, pero también a que los epigenomas de los tumores primarios comparten gran similitud con las metástasis que originan. No obstante se han identificado incrementos de metilación en promotores de genes supresores de metástasis cuya inactivación promueve el fenotipo invasivo, y confiere a las células ventajas adaptativas para establecerse en los órganos colonizados (Rodenhiser DI et al, 2009; Carmona FJ y Esteller M, 2010). Los productos de estos genes son mediadores de adhesión celular, inhibidores de proteasas, represores de angiogénesis, y reguladores de proliferación y apoptosis.

2.2 Alteraciones en los perfiles de modificación de histonas y de expresión de RNAs no codificantes en cáncer

Los defectos en el mantenimiento de las marcas de histonas son un rasgo general del desarrollo tumoral, y actúan sinérgicamente con las alteraciones de metilación del ADN para promover el fenotipo tumoral (**Figura 6**). Las alteraciones más estudiadas en relación a transformación celular son la desacetilación de histonas y cambios en la metilación de diversos residuos. No obstante, en comparación al gran número de modificaciones descritas hasta la fecha, sólo unas pocas han sido relacionadas con cáncer.

La pérdida de acetilación en la lisina 16 de la histona H4 (H4K16Ac), así como de trimetilación en H4K20, se han descrito en relación a la hipometilación de secuencias repetitivas, y fueron las primeras alteraciones descritas en cáncer (Fraga MF et al, 2005). La bajada de H4K16Ac conlleva una compactación de la cromatina, y se ha relacionado con resistencia a quimioterapia (Elsheikh SE et al., 2009; Hajji N et al., 2010). El desequilibrio en la distribución de estas marcas viene también dado por el desbalance que se genera entre sus efectores. La H4K16Ac es promovida de forma específica por la enzima hMOF (Gupta A et al, 2008), mientras que la SIRT1 lleva a cabo la reacción opuesta. En cáncer de mama y meduloblastoma se ha descrito una bajada en los niveles de expresión de hMOF (Pfister S et al, 2008), mientras que la expresión de la desacetilasa SIRT1 se ha observado incrementada en cáncer de piel y próstata (Huffman DM et al, 2007) promoviendo la supervivencia celular.

La trimetilación de H3K9 (H3K9me3) es otra marca característica de dominios de heterocromatina, y se ha asociado a la represión génica aberrante en cáncer (Derks S et al, 2009). Por otro lado, la acetilación del mismo residuo (H3K9ac) se asocia con inicios de transcripción activos puesto que protege al ADN de ser metilado. En cáncer de próstata y ovario se ha correlacionado el descenso de H3K9ac con progresión tumoral, mientras que el aumento de H3K9me3 se ha observado en otros tipos tumorales estudiados (Pogribny IP et al, 2007). Ambas marcas son funcionalmente opuestas y exclusivas, ya que es necesario una disminución de H3K9ac para que aumenten los niveles de H3K9me3.

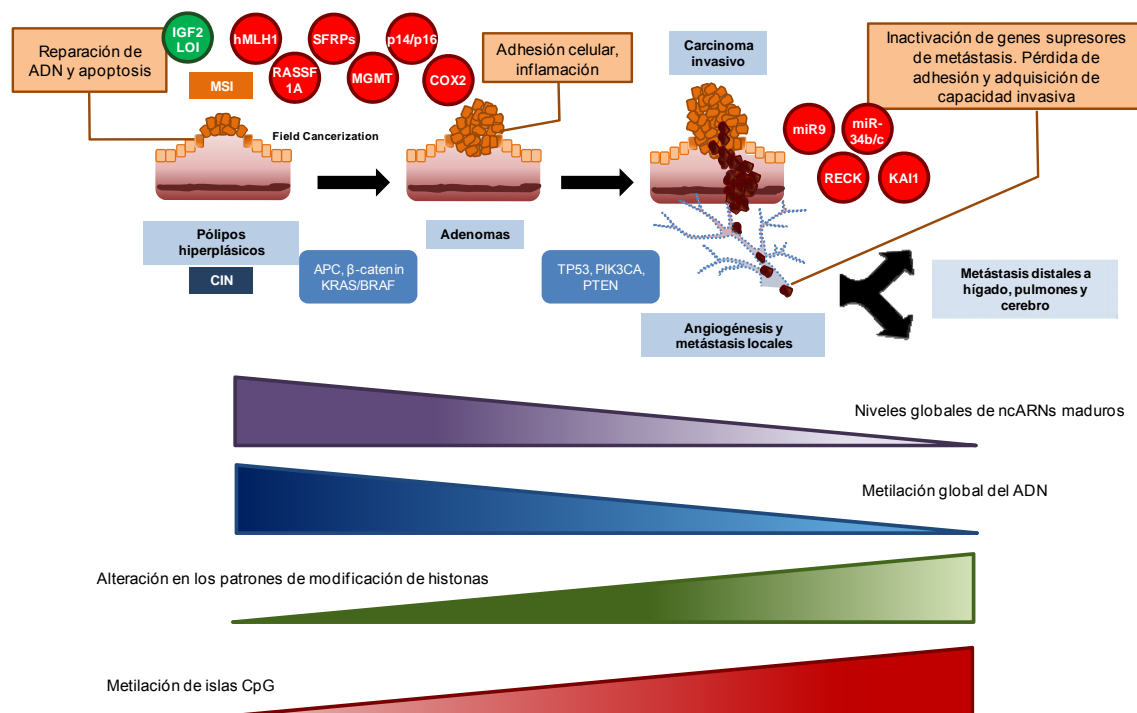


Figura 6: Defectos epigenéticos en carcinogénesis. En cáncer de colon, paradigma de investigación epigenética en cáncer, se han identificado numerosas alteraciones epigenéticas desde lesiones premalignas e histológicamente normales, hasta las fases más avanzadas de carcinoma metastásico. Defectos en la impronta, hipometilación global del ADN e inactivación transcripcional de genes supresores tumorales y de metástasis son alteraciones asociadas a procesos de metilación aberrante del ADN. La acumulación de defectos en las modificaciones de las histonas, y en los niveles de ncARNs se han caracterizado también a lo largo de la progresión tumoral.

Por último, además de las modificaciones de histonas existen varias variantes de histonas, relacionadas con las que conforman el núcleo globular, pero con propiedades distintas que afectan a la conformación del nucleosoma. La variante de histona macroH2A (mH2A), variante de la H2, se asocia con represión transcripcional, y está implicada en el mantenimiento del silenciamiento del cromosoma X durante el

desarrollo embrionario (Costanzi C et al, 2000; Pasque V et al, 2011). En melanoma, se ha relacionado la pérdida de expresión de mH2A por hipermetilación de su promotor, con una relajación de la cromatina y un efecto pro-metastático como consecuencia de la desregulación transcripcional de genes de proliferación e invasión (Kapoor A et al, 2011).

Numerosos trabajos han descrito alteraciones en los patrones de expresión de miRNAs y otros RNAs no codificantes (**Figura 6**). Las causas de esta desregulación incluyen amplificación o delección (Calin G y Croce C, 2006), transactivación inapropiada (Dews M et al, 2006), mutación génica (Jazdzewski K et al, 2008), inactivación epigenética (Lujambio A et al, 2007), o alteraciones en la maquinaria de procesamiento (Melo SA et al, 2009; Melo SA et al, 2010). Teniendo en cuenta la amplia red de genes sujetos a regulación por miRNAs, la subida o bajada de niveles de expresión de estas moléculas implica una desregulación amplificada de los genes diana. Comparando perfiles de miRNAs y mRNAs entre tejidos cancerosos y sus normales, se ha observado cambios globales del *miRNA-oma* con gran repercusión en el transcriptoma. Algunos miRNAs que aparecen más frecuentemente desregulados en cáncer que otros, parecen desempeñar funciones importantes para el mantenimiento y progresión tumoral. Por ejemplo, el *cluster* de miR-17~92, está amplificado y promueve el desarrollo de linfomas B (Ventura A et al, 2008; Koralov SB et al, 2008); la delección de la familia de miRNAs supresores tumorales *let-7* se ha documentado en varios tipos de cáncer (Heo I et al, 2008; Newman MA et al, 2008; Viswanathan SR et al, 2008); la inactivación de los miR-148a, miR-34b/c, and miR-9 en tumores primarios por hipermetilación de su región promotora, promueve el desarrollo de metástasis (Lujambio A et al, 2008) en diversos tipos tumorales.

3 Metilación del ADN y metástasis

El proceso de metástasis consiste en una secuencia de eventos interrelacionados por los que las células tumorales adquieren capacidad de invadir los tejidos adyacentes, entrar en el torrente circulatorio -sanguíneo o linfático-, y extravasarse en órganos distales donde proliferan y forman nuevos focos tumorales (Fidler IJ, 2003; Eccles SA y Welch DR, 2007; Carmona FJ y Esteller M, 2011). En las células tumorales, éstas capacidades resultan del balance de programas de expresión que favorecen su diseminación, y antagónicamente, genes específicos supresores de metástasis cuya expresión reprime el fenotipo metastático sin afectar a la capacidad tumorigénica (Fidler IJ, 2003; Eccles SA y Welch DR, 2007; Carmona FJ y Esteller M, 2011).

La frecuencia de cambios que se producen es menor que en las fases de transformación, por lo que los perfiles de metilación aberrante de las metástasis reflejan en gran medida los del tumor primario de origen (Konishi K et al, 2011; Fernandez AF et al, 2012). La naturaleza dinámica de las alteraciones epigenéticas hace que sean un mecanismo importante en la modulación del fenotipo metastático. Se ha documentado hipermetilación aberrante de genes cuyo silenciamiento epigenético promueve la pérdida de adhesión celular, favorece la invasión del estroma, o permite la evasión de apoptosis, constituyendo un estímulo para el desarrollo de metástasis (**Tabla 2**). La recuperación de su expresión, bien por manipulación genética o por tratamiento con agentes demetilantes, reduce la eficiencia invasiva y la consiguiente formación de focos metastáticos (Liu CY et al, 2009; Yu J et al, 2010; Carmona FJ et al, 2011; Png KJ et al, 2011) . Además de genes codificantes, se han identificado microRNAs cuya inactivación tiene efecto funcional sobre el fenotipo metastático (Saito Y y Jones PA, 2007; Lujambio A et al, 2008). La inactivación de microRNAs por hipermetilación de sus promotores, al igual que ocurre en genes supresores tumorales, tiene gran repercusión en el fenotipo celular al estar regulando la expresión múltiples genes implicados en diversas vías.

Gen supresor de metástasis	Tipo tumoral	Consecuencias funcionales
<i>RUNX3</i> , runt-related transcription factor 3	Mama, melanoma, vejiga, pulmón	Inhibe proliferación e invasión celular
<i>RECK</i> , membrane-anchored glycoprotein	Colon, mama, pulmón	Inhibición de angiogénesis por represión de VEGF
<i>CDH1</i> , epithelial cadherin	Múltiples tipos	Mediador de adhesión celular, motilidad, proliferación y organización del citoesqueleto. La pérdida de expresión se asocia con fenotipo metastático
<i>CDH11</i> , osteoblast cadherin	Melanoma, cabeza y cuello, retinoblastoma	Mediador de adhesión celular, motilidad, proliferación, y organización del citoesqueleto
<i>CASP8</i> , caspase 8	Meduloblastoma	Molécula pro-apoptótica
<i>KISS</i> , KiSS-1 metastasis-suppressor	Mama, melanoma	Mediador de adhesión célula-estroma
<i>RKIP</i> , phosphatidylethanolamine-binding protein 4	Múltiples tipos	Promueve apoptosis e inhibe proliferación y migración celular
<i>TBX5</i> , T-box transcription factor 5	Colon	Inhibe proliferación e invasión celular
<i>EPHB6</i> , Eph receptor B6	Mama, pulmón	Favorece la adhesión celular e inhibe motilidad
<i>BRMS1</i> , breast cancer metastasis suppressor	Mama, melanoma, pulmón, cabeza y cuello	Componente del complejo desacetilasa de histonas mSin3a. Inhibe la expresión de genes anti-apoptóticos y promueve el <i>anoikis</i> en células no adheridas a sustrato
<i>MTSS1</i> , metastasis suppressor 1	Colon, mama, vejiga, hepatocelular	Promueve la organización del citoesqueleto para favorecer adhesión celular
<i>DRG-1</i> , developmentally regulated GTP binding protein 1	Colon, mama	Implicado en diferenciación, proliferación y control de ciclo celular

Tabla 2: Genes supresores de metástasis inactivados por hipermetilación de su promotor.

4. Metilación del ADN en clínica: biomarcadores y farmacoepigénica

La identificación de firmas pronósticas en cáncer es una de las metas de la oncología clínica. Históricamente, los primeros biomarcadores usados en diagnóstico fueron el estado de receptores de hormonas en cáncer de mama (McGuire WL, 1975), y las alteraciones cromosómicas observadas en pacientes de leucemia linfocítica

crónica (CLL) (Dierlamm J et al, 1997). Con la llegada de las técnicas de análisis genómico, se incorporaron los perfiles mutacionales y de expresión génica que se emplean con fines diagnósticos (Harbeck N et al, 2010), pronósticos (Salazar R et al, 2011) o como predictores de respuesta a tratamiento (Barretina J et al, 2012).

Dado el impacto de las modificaciones epigenéticas en la expresión génica, y la consistencia de los patrones de metilación entre tipos tumorales (Esteller M et al 2001; Fernandez AF et al 2012), los marcadores basados en perfiles de metilación del ADN pasaron a constituir una valiosa herramienta clínica. En cáncer de próstata, la hipermetilación del promotor de *GSTP1* (glutathione S-transferase) se da en más del 80% de los pacientes de cáncer de próstata, y su detección en orina sirve para el diagnóstico (Esteller M et al, 1998); la inactivación epigenética de *MGMT* (O-6-methylguanine-ADN methyltransferase) en pacientes afectados por glioblastoma predice la respuesta a terapia con agentes alquilantes (Esteller M et al, 2000); la detección de *SEPT9* (septin 9) metilado en sangre es un marcador independiente que se encuentra en fase de ensayo clínico para diagnóstico no invasivo de cáncer de colon (deVos T et al, 2009), y ha mostrado resultados prometedores para su detección en heces (Carmona FJ et al, 2013). Además, los biomarcadores de metilación presentan ventajas frente a otros basados en perfiles mutacionales o de expresión. Los cambios en la metilación del ADN son estables en el tiempo y no cambian rápidamente en respuesta a estímulos externos, mientras que la expresión génica es más variable y por tanto menos fiable.

A diferencia de las mutaciones genéticas, las alteraciones epigenéticas son reversibles, bien en contexto fisiológico, o por tratamiento con fármacos inhibidores de las DNMTs o HDACs, permitiendo el restablecimiento de los niveles de expresión génica normales.

Los agentes demetilantes, 5-Azacitidina (Vidaza) y 5-aza-2'-deoxicitidina (Dacogen), actúan bloqueando la actividad de las DNMTs e interrumpiendo así el mantenimiento de los patrones de metilación aberrantes que vuelven a niveles normales tras rondas sucesivas de replicación (Robert MF et al, 2003; Beaulieu et al, 2002). Estos compuestos han sido aprobados por la FDA (*US Food and Drug Administration*) en el tratamiento de síndrome mielodisplásico, consiguiendo sensibles mejoras en la supervivencia de los pacientes. En el tratamiento de tumores sólidos, los agentes demetilantes se encuentran en fases de ensayos clínicos, pero estudios preliminares apuntan resultados prometedores en pacientes de cáncer de pulmón, mama y colon (Issa JP y Kantarjian HM, 2009; Juergens RA et al, 2011). Por otro lado, el uso de

agentes inhibidores de HDACs como SAHA (ácido suberoilánilido hidroxámico) o TSA (trichostatina A) han demostrado un efecto sinérgico en combinación con agentes demetilantes en la reversión de la metilación aberrante de genes supresores tumorales, y se están testando para el tratamiento de linfomas cutáneos de células T (Kirschbaum et al, 2011; Stathis et al, 2011).

OBJETIVOS

La metástasis es el principal causante de las muertes asociadas a procesos neoplásicos, por lo que identificar los mecanismos moleculares implicados es uno de los objetivos centrales de la investigación oncológica actual. Las alteraciones epigenéticas, y especialmente la metilación aberrante del DNA, se han reconocido como eventos característicos de los procesos de transformación maligna, y su caracterización ha permitido comprender mejor las bases moleculares del cáncer. No obstante, los cambios que se producen en relación a la diseminación metastásica de las células tumorales han sido estudiados en menor profundidad.

Con el avance de las técnicas de análisis genómico se ha incrementado la resolución de análisis, a la vez que se han reducido costes y duración de los protocolos. Además, estas plataformas permiten el estudio sistemático de todos los elementos codificantes del genoma, permitiendo así la identificación de nuevas alteraciones y mecanismos.

Con todo ello, el objetivo central de esta tesis doctoral ha sido el de investigar las alteraciones en los patrones de metilación del DNA que promueven la diseminación metastásica de las células tumorales.

Para llevar esto a cabo, se han empleado distintas plataformas de análisis epigenómico persiguiendo los siguientes puntos:

1. Identificación de genes supresores de metástasis inactivados por hipermetilación de su promotor
2. Caracterización de los patrones aberrantes de metilación del DNA en la progresión del melanoma
3. Identificación de biomarcadores de metilación con potencial utilidad clínica

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Líneas celulares y muestras tumorales humanas empleadas

1.1. Cultivo de líneas celulares tumorales humanas

Las líneas celulares humanas de cáncer se crecieron en medio de cultivo DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) con 4.5 g/l de glucosa, L-glutamina, y suplementado al 10% con suero bovino fetal y un 1% de penicilina/estreptomicina, en un incubador humidificado a 37°C de temperatura y con un 5% de CO₂.

Las líneas celulares pareadas derivadas de tumor primario y metástasis a nódulo linfóide, fueron adquiridas de la ATCC (American Type Culture Collection) en el caso de las IGR39 e IGR37 (melanoma primario y metastático); y proporcionadas por la Dra Suzanne Eccless (The Institute of Cancer Research, McElwain Laboratories, Sutton, UK) en el caso de las SIHN-011A y SIHN-011B (cáncer de cabeza y cuello primario y metastático).

1.2 Relación de muestras tumorales humanas

En el primer estudio presentado, se obtuvieron 119 muestras de tumores primarios, con los tejidos normales correspondientes (n=12), pertenecientes a dos tipos tumorales: cabeza y cuello (n=68) y melanoma (n=51). Las muestras fueron proporcionadas por el banco de tejidos *Biobank HUB-ICO-IDIBELL*.

En el segundo trabajo, se reunieron un total de 232 muestras. De éstas, para fase de descubrimiento se analizaron 15 tejidos normales, 30 melanomas primarios, y 33 melanomas metastáticos en tránsito cuyas características están resumidas en la **Tabla s1** del Anexo 1. Para la fase de validación, se analizaron 33 tejidos normales, 160 melanomas primarios, y 46 metástasis. Todas las muestras contaban con un registro clínico detallado. Las muestras fueron proporcionadas por la Universidad de Maastricht (Países Bajos), la Universidad Católica de Lovaina (Bélgica), la Universidad de Lund (Suecia), y la Universidad de Uppsala (Suecia).

En todos los casos, las muestras tumorales fueron obtenidas siguiendo los procedimientos estandarizados y respetando los códigos éticos correspondientes.

2. Estudio de metilación del ADN

2.1 Extracción del ADN

El protocolo de extracción de ADN se realizó como se detalla a continuación. Se recogieron las células adherentes, tras desprenderlas de la placa incubándolas 5 minutos con tripsina (Sigma), y se centrifugaron durante 10 segundos a 4.000 rpm. A continuación las células se resuspendieron y lavaron en 2 ml de PBS (Phosphate Buffered Saline), se volvieron a centrifugar, y se añadieron 675 µl de Tampón de Lisis de DNA (Sacarosa 0,65 M, Tris-HCl 20 mM pH 7,8, MgCl₂ (cloruro de magnesio) 10mM, Tritón X-100 al 2%) por cada muestra. A continuación se añadieron 15 µl de Proteinasa K (a 10 mg/ml, Roche) y 20 µl de RNasa (a 10 mg/ml, Qiagen) y se incubaron en agitación a 37°C durante toda la noche.

A continuación, se añadió un volumen de fenol:cloroformo:isoamílico (Qiagen) y se mezcló en la noria durante 10 minutos. Las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 13.000 rpm, recuperando la fase acuosa (500 µl). Se añadió un volumen de cloroformo se mezcló por inversión, y se centrifugó nuevamente 5 minutos a 13.000 rpm. La precipitación del DNA se llevó a cabo añadiendo 0,1 volúmenes de acetato de amonio 10M, 1 volumen de isopropanol absoluto e incubando las muestras durante 3 horas a -80°C. Para recuperar el DNA se centrifugó durante 15 minutos a 13.000 rpm. El ADN precipitado se lavó 2 veces con etanol al 70% (v/v). Finalmente, las muestras se resuspendieron en agua destilada en el volumen apropiado según el precipitado.

2.2 Modificación del ADN con bisulfito sódico

Para la conversión del ADN se empleó el kit EZ DNA Methylation-Gold (Zymo Research) utilizando un protocolo modificado al indicado por el fabricante. La preparación de las muestras, reactivos, y protocolo de purificación se hizo tal como recomienda la casa comercial; la reacción de conversión se llevó a cabo según el protocolo publicado por Bibikova *et al.*, 2009 según el cual se incubaba el ADN durante 16 h a 50°C en un termociclador, pasando por una etapa de desnaturalización cada hora a 95°C durante 30 s. El ADN convertido (ADN-bs) se eluyó a una concentración final de 20 ng/µl.

2.3 Secuenciación genómica del ADN modificado

Para la fase de amplificación por PCR, se emplea 1 µl del ADN-bs en un volumen de reacción final de 25 µl, junto con cebadores específicos a 0,2 µM, tampón 1X de Ecostart, MgCl₂ a 1,5 mM, dNTP a 0,2 mM, y 1,5 U de Taq polimerasa (Ecostart). Los cebadores fueron diseñados con el programa *Methyl Primer Express* (Applied Biosystems), y las condiciones de PCR que se emplearon fueron las siguientes:

- 1) 10 minutos a 95°C
 - 2) 30 segundos a 95°C
 - 3) 30 segundos a X°C (X= temperatura de *annealing*)
 - 4) 30 segundos a 72°C
- Se repitieron los pasos 2, 3 y 4 un total de 40 ciclos
- 5) 7 minutos a 72°C
 - 6) mantener a 4°C

Los productos amplificados se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 2% (agarosa de Conda en TBE (Tris Borato Edta) 0,5 X), usando SYBR Safe como agente intercalante, y se extrajeron con el kit QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

A continuación se clonaron los fragmentos amplificados en el vector pGEM-TEasy (Promega). Se utilizaron 5 µl de Rapid Ligation Buffer 2X, 1 µl de enzima DNA ligasa T4, 1 µl de vector pGEM-T (50 ng/µl) y 3 µl de inserto (a 8 ng/µl). Cuando la intensidad de la banda de DNA es lo suficientemente intensa, se puede utilizar la mitad de las cantidades indicadas. La ligación se lleva a cabo durante toda la noche a 4°C ó 3 horas a 15°C. Para calcular la cantidades relativas de vector e inserto se utilizó la siguiente fórmula, que viene en las instrucciones del fabricante (Promega):

$$\text{Ng de inserto} = (\text{Ng de vector} \times \text{kb de inserto} \times \text{ratio molar inserto/vector}) / \text{kb de vector}$$

El vector ligado se propagó en las bacterias competentes. Para la obtención de bacterias competentes, las bacterias *Escherichia coli* (E. coli) de la cepa NovaBlue 5α, se crecieron en precultivo en 5 ml de LB (Luria-Bertani). Después se creció 1 ml del precultivo en 100 ml de LB, hasta que el cultivo alcanzó una densidad óptica a 600nm de 0,2-0,6 (unas 12 horas), de forma que las bacterias estuvieran creciendo en fase exponencial. Se centrifugaron las bacterias a 5.000 rpm durante 5 minutos a 4°C y se resuspendieron en 10 ml de CaCl₂ (cloruro cálcico) a 0,1 M frío. Se mezcló bien y se dejó en hielo otros 30 minutos. Se añadió glicerol (Invitrogen) para dejarlo al 15% y se congeló en alícuotas a -80°C.

Para transformar las bacterias con el vector se mantuvieron las bacterias competentes en contacto con el vector durante 30 minutos a 4°C. Después se realizó un choque térmico durante 1 minuto a 42°C, para desestabilizar la membrana bacteriana, y otra vez, 3 minutos en hielo. Se añadieron 700 µl de LB y se dejó una hora en agitación a

37°C. Después, las bacterias se sembraron en placas de agar-LB. El sistema X-Gal del vector permite seleccionar los clones positivos para el inserto según el color de las colonias. Las colonias azules contienen el plásmido religado sin el inserto (permitiendo la expresión del gen LacZ), mientras que en las blancas positivas, la ligación del inserto en el sitio de multiclonaje (MCS) ha interrumpido la secuencia del gen LacZ. Para poder hacer esta distinción es necesario que las bacterias se siembren en placas con ampicilina (ya que el vector presenta esta resistencia); con IPTG (Isopropyl μ -D-1-thiogalactopyranoside, de Sigma), que es el inductor de la expresión de LacZ; y X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolyl-beta-d-galactoside, de Sigma), que es el sustrato de LacZ y se degrada transformándose en un subproducto azul. Se utilizaron placas de agar-LB con 50 μ g/ml de ampicilina; 100 μ l de IPTG 100 mM (IPTG 100 mM, 1,2 g de IPTG, 50 ml de agua), 20 μ l de 50 mg/ml de X-gal. Las bacterias se crecieron durante 20 horas a 37°C y después se analizaron los clones.

Para ello, se seleccionaron 8-10 colonias positivas (blancas) para cada gen/muestra y se crecieron toda la noche a 37°C en agitación a 500 rpm en medio LB con ampicilina (50 μ g/ml). Se extrajo el DNA mediante miniprep utilizando el kit Montage Plasmid Miniprep 96 (Millipore) que permite hacer las minipreps en placas de 96, siguiendo las instrucciones especificadas por el fabricante.

Tras extraer el DNA plasmídico se determinaron los estados de metilación de los distintos promotores mediante secuenciación, utilizando un cebador para T7 contenido en el vector. La secuenciación automática se llevó a cabo en un secuenciador ABI 377 (Applied Biosystems) y las secuencias obtenidas se analizaron mediante Sequencing Analysis 5.2 (Applied Biosystems). Las secuencias se analizaron por alineamiento múltiple mediante el programa BioEdit versión 7.0.8.0.

2.4 PCR específica de metilación

La PCR específica de metilación (MSP) proporciona información cualitativa del estado de metilación de una secuencia concreta. Para ello se utilizaron cebadores específicos para ADN modificado, asumiendo los estados metilado y no metilado y que hibridasen con varias CpGs. Se diseñaron dos pares de cebadores para cada uno de los genes analizados, utilizando el programa *Methyl Primer Express*. La primera pareja de cebadores amplifica una muestra en la que las citosinas seguidas de guanina no se encuentran metiladas. Así, la secuencia tras el tratamiento del ADN con bisulfito sódico presenta uracilos (que se convierten en timinas tras el primer ciclo de PCR) en lugar de las citosinas de la secuencia original. El segundo par de cebadores amplifica

la secuencia si las citosinas están metiladas, en cuyo caso las citosinas se mantendrían inalteradas tras el tratamiento. Por lo tanto, para cada muestra se llevaron a cabo dos reacciones de PCR empleando el mismo ADN molde: una con los cebadores complementarios a la secuencia en caso de estar metilada (M: methylated), y otra empleando los cebadores complementarios en caso de no estarlo (U: unmethylated). Las reacciones se realizaron en un volumen de 15 µl manteniendo la estequiometría de la reacción de secuenciación, y empleando las mismas condiciones de amplificación, pero reduciéndolo a 35 ciclos.

Como control de funcionamiento de los cebadores *methylated* se usó ADN metilado in vitro (IVD: in vitro methylated DNA) con la enzima metiltransferasa SssI. Para obtener IVD se partió de 50 µg de DNA en 220 µl de volumen final de agua y se añadieron 25 µl de buffer (NE buffer 10 X New England Biolab), 2.5 µl de SAM 32 mM (S-adenosyl-methionine, New England Methyonine) y 6,25 µl (25 unidades) de SssI Methylase (SssI) 4000 U/ml. Se incubó 4 horas a 37°C. Al cabo de ese tiempo se añadieron 5 µl de SAM 32 mM y 3,1 µl de SssI 4000 U/ml y se incubó otras 4 horas a 37°C. Para purificar el ADN se siguió el protocolo de extracción de ADN explicado anteriormente. El ADN metilado se modificó con bisulfito sódico para su posterior uso en la reacciones de MSP. Por otro lado, se utilizó ADN de linfocitos normales modificado con bisulfito como control de los cebadores *unmethylated*. La lista de todos los cebadores utilizados para las MSPs de los genes estudiados se puede encontrar en la **Tabla s2** del Anexo 1.

2.5 Pirosecuenciación

La pirosecuenciación cuantifica de forma directa el estado de metilación de las CGs incluidas en fragmentos cortos de DNA amplificado. En una primera fase se amplifica la región de interés por PCR, empleando una pareja de cebadores en que uno de ellos está biotinilado. Los cebadores se diseñaron con el programa PyroMark Assay Design (QIAGEN). Idealmente, éstos no solapan dinucleótidos CG, de manera que la amplificación del DNA modificado no sea sesgada. La amplificación se lleva a cabo siguiendo la estequiometría establecida (3µl buffer, 3µl dNTPs 2mM, 0,9 µl MgCl₂, 0,3 µl F/R 10 µM, 0,12 µl Taq polimerasa, 20,38 µl agua, por reacción), y manteniendo la reacción durante 50 ciclos.

El producto amplificado se emplea para la reacción de pirosecuenciación que se basa en la cuantificación del ratio C/T de los nucleótidos CG susceptibles de ser metilados. Al producto de reacción se añade sefarosa disuelta en binding buffer de modo que las

cadena que presentan un residuo de biotina en su extremo 5' se unan a la estreptoavidina de la superficie de las esferas de sefarosa. Tras fases sucesivas de lavado y desnaturalización, las esferas de sefarosa con el DNA unido se mezclan con un tercer primer de secuenciación complementario a la hebra molde, y a partir del cual se producirá la elongación y cuantificarán los nucleótidos (dNTPs) incorporados. La cuantificación se lleva a cabo mediante una cascada de enzimas -DNA polimerasa, ATP-sulfurilasa, luciferasa y apirasa- y dos sustratos -adenosina 5' fosfosulfato y luciferina- mezclados en la reacción. Cuando un dNTP complementario se incorpora a la cadena molde unida a la sefarosa, la DNA polimerasa cataliza su unión produciendo la liberación de pirofosfato (PPi); de esta forma, la cantidad de PPi liberada es equimolar a la de dNTP incorporado. La liberación de PPi desencadena la formación de ATP por reacción con la adenosina 5', y a su vez la conversión de luciferina en oxiluciferina, generando un pulso de luz cuya intensidad es proporcional a la cantidad de dNTPs incorporados. Tras cada reacción, la enzima apirasa degrada el ATP y los dNTPs no incorporados. La adición consecutiva de dNTPs genera un pirograma. Éste representa la dispensación secuencial de dNTPs y la intensidad lumínica asociada que permite su cuantificación. Los experimentos de pirosecuenciación se llevaron a cabo en el equipo Pyromark Q96 (QIAGEN). La secuencia de los cebadores empleados en el estudio de progresión de melanoma cutáneo se encuentra detalla en la **Tabla s3** del Anexo 1.

2.6 Plataformas de análisis epigenómico

Para estudiar de forma global el perfil de metilación del ADN en estudio se emplearon dos tipos de arrays de metilación comercializados por la empresa Illumina, Inc (San Diego, USA): GoldenGate Methylation Cancer Panel I (GoldenGate), y el Infinium HumanMethylation450k BeadChip (Infinium 450K).

2.6.1 GoldenGate Methylation Cancer Panel I

El array GoldenGate cuantifica la metilación de un total de 1.505 loci CpG correspondientes a 807 genes. Entre éstos, el 28,6% contienen un CpG por gen, un 57,3% contienen dos, y un 14,1% contienen tres o más sitios CpG interrogados. Los genes seleccionados incluyen oncogenes y genes supresores tumorales, genes implicados en reparación del ADN, control de ciclo celular, diferenciación, apoptosis, diferenciación e *imprinting*. Mediante el uso de sondas alelo-específicas y locus-específicas, se consigue la cuantificación del estado de metilación de los CpG (valor β), basado en el ratio de la fluorescencia emitida por un alelo relativa a la suma de las señales de los alelos metilados (M) y no metilados (U):

$$\beta = [Max(M,0)]/[Max(U,0) + Max(M,0) + 100]$$

El valor β es una medida cuantitativa del estado de metilación de CpGs específicos, y varía entre 0 (no metilado) y 1 (completamente metilado). El programa Genome Studio (Illumina) permite calcular estos valores y revisar los controles internos del proceso de hibridación.

Previamente al análisis de los datos, se procedió al filtro de posibles fuentes de variabilidad técnica o biológica que pudieran sesgar los resultados. Para evitar sesgo debido al sexo, se excluyeron los 84 CpGs correspondientes al cromosoma X, dado que las mujeres tienen una de las copias cromosómicas metiladas. Asimismo, se compararon los valores de intensidades detectadas frente al umbral de detección, y se excluyeron aquellas sondas con un valor de $p > 0,01$ en más del 10% de las muestras.

2.6.2 Infinium HumanMethylation450K BeadChip

El array Infinium450K modifica la química que emplea la plataforma GoldenGate, e incrementa la resolución. Así como la plataforma GoldenGate cuantifica la metilación de 1.505 CpGs de 807 genes, el array Infinium450K interroga el estado de metilación de más de 450.000 CpGs a lo largo de todo el genoma. Cubre el 96% de las islas CpG de todo el genoma, múltiples CpG *shores*, y CpGs aislados. Además, el 99% de los genes anotados en la base de datos NCBI Reference Sequence (RefSeq) están cubiertos en todos sus regiones (5'UTR, promotor, cuerpo génico y 3'UTR).

En ambas plataformas, las sondas están clasificadas de acuerdo con su relación a Islas CpG, y al gen anotado más cercano. Mientras que el array GoldenGate restringe el análisis a la región promotora, el Infinium450K amplía el espectro de análisis a todos los compartimentos génicos. En relación a su posición respecto a las islas CpG, los loci se clasifican en tres categorías: (1) loci localizados en el interior de una isla CpG, marcados como *Island*; (2) loci localizados a <2.000 pb de una isla CpG, marcados como *Shores*; y (3) loci situados a más de 2.000 pb de cualquier isla CpG, y marcados como *distant*. En relación a su posición respecto de genes anotados, las sondas se clasifican en: (1) dentro del promotor (TSS1500/TSS200), si se localizan en una región entre 1.500 pb *upstream* y el inicio de transcripción; (2) en la región 5'UTR; (3) en el interior del gen, o *body*; (4) en la región 3'UTR; (5) o en regiones intergénicas.

Para analizar el perfil de metilación de ADN utilizando estas plataformas, se requiere 1 µg de ADN diluido a una concentración de 100 ng/µl. Previo al procesamiento, el ADN

se somete a un control de calidad mediante el cual se evalúa la integridad y cantidad de ADN de doble cadena contenida en la muestra. La integridad del ADN se evalúa mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,3%. Para medir la cantidad exacta de ADN de doble cadena, se emplea el kit Quant-iT™ PicoGreen (Invitrogen) siguiendo las especificaciones del fabricante, y cuantificando por fluorimetría con el Qubit 2.0 (Invitrogen). A continuación comienza el protocolo de conversión e hibridación que sigue las recomendaciones y protocolos establecidos por Illumina (Infinium HD Assay, Methylation Protocol Guide).

2.6.3 Análisis de datos de *arrays* de metilación.

Los datos crudos de intensidad de fluorescencia fueron normalizados empleando el programa Genome Studio (V21010.3, Illumina), empleando *normalización por controles* e incluyendo el filtro corrector de señal de fondo para poder comparar datos de hibridaciones realizadas en distintos arrays. Las intensidades normalizadas se emplearon para calcular los valores de metilación del DNA (Valores beta, β -val).

Las etapas de marcaje con biotina, hibridación, extensión, modificación con bisulfito sódico y de control de calidad, fueron llevadas a cabo según las recomendaciones de la casa comercial. Las sondas que no cumplían los niveles mínimos de intensidad, indicadas con un P-valor > 0.01 , se excluyeron del análisis, al igual que las sondas de genotipado (rs) y aquellas que diseñadas en zonas con polimorfismos (SNP) descritos. Para su análisis, las muestras son agrupadas en función de su categoría biológica (normal, primario, metástasis), y las medianas de sus valores de metilación fueron calculadas para cada sonda. Para llevar a cabo las comparaciones entre grupos, se calcularon las diferencias entre medianas de metilación por grupos (DGMB), y se seleccionaron aquellas que presentaban mayores cambios ($DGMB \geq 0.25$). A continuación, se aplicaron test pareados de Mann-Whitney con *false discovery rate* (FDR), y se seleccionaron aquellas sondas que presentaban diferencias inter-grupos estadísticamente significativas (P-valor < 0.05 ; DiffScore $> \pm 13$). Asimismo, el software GenomeStudio permite realizar análisis de metilación diferencial, devolviendo la significancia estadística de las comparaciones (DiffScore) y la diferencia media de metilación (Delta beta) entre los grupos comparados.

3. Análisis de expresión génica

3.1 Extracción de ARN

Para la extracción del RNA se utilizó Trizol (Invitrogen). Se resuspendieron las células en 1 ml de Trizol y cada muestra se dejó 5 minutos a temperatura ambiente. Se

añadieron 200 µl de cloroformo (Sigma), agitando cuidadosamente durante 15 segundos, y se dejó a temperatura ambiente durante 3 minutos más. Se centrifugó a 13.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se transfirió la fase superior acuosa a un tubo nuevo (unos 600 µl). Se añadieron 500 µl de isopropanol (Fluka) al 100% y se dejó 10 minutos a temperatura ambiente. Se volvió a centrifugar a 13.000 rpm durante 15 min a 4°C, precipitando el RNA, que quedó en el fondo del tubo, formando un precipitado de aspecto gelatinoso. Se lavó con 1,5 ml de etanol (Fluka) al 80% (el etanol al 80% se preparó con agua libre de RNasas, como el agua con DEPC (dietilpirocarbonato) al 0.1%). Se agitó con vórtex y se centrifugó a 7.600 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se eliminó con precaución el sobrenadante y se dejó el tubo abierto, a temperatura ambiente, durante unos 5 minutos, para evaporar los restos de etanol. Después se resuspendió en agua libre de RNasas, en un volumen apropiado (unos 50 µl).

El RNA obtenido se trató con DNasas (Turbo DNA free, de Ambion). Para un volumen de 50 µl se añadieron 5 µl de buffer (tampón) Turbo DNase 10X y 1 µl de Turbo DNase. Se incubó durante 20-30 minutos a 37°C. Para inactivar la DNasa se añadieron 5 µl de reactivo inactivante y se mezcló bien durante 2 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 13000 rpm durante 1 minuto, a temperatura ambiente, y se transfirió el sobrenadante con el correspondiente RNA a un nuevo tubo.

3.2 Análisis de bases de datos públicas de expresión génica

Las bases de datos se descargaron del *Gene Expression Omnibus* (GEO). Los datos fueron normalizados con el método *Robust Multi-array Average* (RMA), y las diferencias de expresión fueron calculadas usando la aplicación *Linear Models for Microarray Data* (limma). Aquellas sondas con cambios de expresión dos veces superiores (2-fold) entre la muestra problema y la referencia y con un Q-valor < 0.05 se consideraron estadísticamente significativas. En el proyecto dedicado a la caracterización de alteraciones en la metilación del DNA asociados a progresión de melanoma, se empleó la base de datos publicada por Scatolini *et al.*

3.3 Análisis de expresión génica por RTPCR y q-RTPCR

Para medir los niveles de expresión de los genes investigados, se usó RT-PCR semi-cuantitativa y cuantitativa (q-RTPCR). Para la RT-PCR se hizo PCR con los cebadores del gen investigado, y cebadores de genes de expresión constitutiva como normalizadores de la expresión. La estequiometría de la reacción de amplificación es la misma que la empleada en la secuenciación de ADN-bs, utilizando aquí como molde

25 ng de cDNA, y 60°C como temperatura de *annealing*. Los productos de RT-PCR se analizaron en un gel de agarosa al 2% y se visualizaron con luz azul.

Las q-RT-PCR se realizaron en el 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems), en placas de 384 pocillos, empleando el método de cuantificación relativa. En la mezcla de reacción, se utilizaron 0,3 µl de cada cebador a 5 µM, 5 µl de SYBR Green PCR reaction mix (2X) (Applied Biosystems), y 4,5 µl de cDNA a 10 ng/µl. Como genes normalizadores, se emplearon *HPRT1*, *PPIA*, y *RNA18s*. El análisis de los datos se hizo con el programa SDS 2.4 (Applied Biosystems). La lista de todos los cebadores utilizados para las RT-PCRs (cuantitativa y semi-cuantitativa) pueden encontrarse en la **Tabla s4** del Anexo 1.

4. Análisis de expresión proteica

4.1 Análisis de expresión proteica por Western-blot

Para obtener los extractos proteicos, las células se centrifugaron y los precipitados se resuspendieron en tampón de lisis RIPA (1x PBS, 1% Nonidet P-40), 0,5% deoxicolato sódico, 0,1% SDS) con inhibidor de proteasas Complete (Roche) añadido en el momento de la extracción. Tras incubar las muestras 30 minutos en hielo se sonicaron 5 minutos usando el Bioruptor y manteniendo las muestras en hielo para evitar la degradación de las proteínas. Después, las muestras se centrifugaron a 4°C a 13.000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante, que contiene el extracto proteico total, fue alicuotado y conservado a -80°C.

La concentración proteica de los extractos se determinó mediante colorimetría utilizando el Bio-Rad Protein Assay Kit (BioRad), basado en el método de Bradford (Bradford, 1976), que mide la variación de color del reactivo azul brillante de Coomassie G-250 (Panreac) (con un máximo de absorbancia de 465 nm a 595nm). Se mezclaron 20 µl de proteína con 1ml del reactivo azul brillante de Coomassie diluido y se determinó la concentración midiendo la absorbancia a 595 nm. La curva de calibración se hizo con diluciones seriadas de BSA (albúmina de suero bovino obovine serum albumin), de 0,2 mg/ml a 0,9 mg/ml.

Se fraccionaron 100 µg de extracto proteico total en un gel de acrilamida-SDS (SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) siguiendo el protocolo descrito (Laemmli, 1970). Los geles de acrilamida se prepararon a un porcentaje adecuado según el tamaño de las proteínas analizadas (entre 7,5 y 15%) en placas de minigel Xcell SureLock® Mini-Cell (Invitrogen) en un volumen de 10 ml.

En primer lugar se preparó un gel separador con acrilamida-bisacrilamida 37,5:1 (Bio-Rad) al 7,5-15% (p/v), Tris-HCl 0,38M pH 8,8 y SDS 0,1% con persulfato amónico (APS, ammonium persulfate, $(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$) al 0,1% y N,N,N',N'-tetrametiletilendiamida (TEMED, BioRad) al 0,01%. Se dejó polimerizar el gel a temperatura ambiente con 1 ml de isopropanol en la parte superior para evitar la inhibición por oxígeno y la formación de burbujas. El isopropanol se retiró, se lavó con agua y se eliminó cualquier traza de agua y sobre el gel separador se cargó un gel concentrador con acrilamida-bisacrilamida (37,5:1) al 5%, Tris-HCl 0,125 M pH 6,8 y SDS 0,1% al que se añadió APS al 0,1% y TEMED al 0,01%. Se colocaron peines de 1 mm de grosor y se dejó polimerizar a temperatura ambiente. Las muestras se pusieron a la misma concentración y volumen en tampón de carga (Tris-HCl 0,25 M pH 6,8, SDS 6,5%), glicerol 25%, 2-β-mercaptoetanol 2 M y azul de bromofenol 0,02% y se desnaturalizaron durante 5 minutos a 100°C. Se cargaron las muestras en el gel, al igual que el marcador de peso molecular preteñido (Kaleidoscope prestained, de Bio-Rad). La electroforesis se llevó a cabo a 25 mA (miliAmperios) en tampón de electroforesis (SDS 0,1%, glicina 1,5%) y Tris-HCl 0,125 M pH 6,8). Una vez separadas por tamaño, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La transferencia se realizó en una cubeta Mini Trans-Blot (Bio-Rad) durante 1 hora a 100 V en un tampón de SDS 0,1%, glicina 1,5%, Tris-HCl 0,125 M pH 6,8 y metanol al 15%. Después, las membranas se bloquearon en leche (Difko™) al 5% en PBS con Tween 20 (Sigma) al 0,1%. Tras el bloqueo, las membranas se incubaron 2 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario a la dilución adecuada en PBS-Tween 0,1% con un 2% de leche. Los anticuerpos utilizados fueron CDH11 (32-1700 ZYMED, Invitrogen) y Nucleolina (C-23, Santa Cruz). A continuación, y tras lavar la membrana con PBS-Tween 0,1%, las membranas fueron incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa, diluido en PBS-Tween 0,1% con 2% de leche, y se lavaron nuevamente con PBS-Tween 0,1%. Para la detección de las proteínas unidas a los anticuerpos se utilizaron los sistemas de quimioluminiscencia ECL y ECL Plus Western Blotting Detection Reagent (Amersham) siguiendo las indicaciones del fabricante y se expusieron a películas fotosensibles Ortho CP-G Plus films (Agfa), utilizando un intensificador de señal (Reflection™ Intensifying Screen, DuPont). El revelado de la película expuesta se llevó a cabo con los líquidos habituales de revelado y fijación fotográfica (Agfa).

4.2 Análisis de expresión proteica por inmunohistoquímica

La tinción inmunohistoquímica para CDH11 (MAB1790, R&D Systems), se realizó a una dilución de 1:50 sobre secciones de tejido incluido en parafina. Las inmunohistoquímicas las realizó la Unidad de Histología Inmunohistoquímica del Hospital Universitario de Bellvitge siguiendo protocolos estandarizados de inmunotinción.

5. Ensayos funcionales *in vitro*

5.1 Tratamiento con fármacos epigenéticos

Las líneas celulares se trataron con una dosis de 5-aza-2'-desoxicitidina (AZA) (Sigma) variable entre 1-5 μ M durante 72 horas, con recambio del medio y de la droga cada 24 horas. Este agente desmetilante revierte el estado de represión transcripcional debido a la metilación del ADN, permitiendo la expresión de aquellos genes que se encuentran metilados. En algunas ocasiones se combinó con inhibidores de desacetilasas de histonas, como la tricotatina-A (TSA) (Sigma), que se añade en las últimas 24 horas del tratamiento a una concentración de 250 nM, consiguiendo una mayor recuperación de la expresión.

5.2 Transfección con vectores de expresión y de interferencia

Los vectores de expresión de CDH11 fueron clonados en el laboratorio, mientras que los vectores de interferencia por ARN-sh se adquirieron de Origene. Para re-expresar CDH11, se amplificó toda la región codificante del transcrito (ENST00000268603, 2.391 pb), empleando cebadores específicos y usando como molde ADNc de la línea de fibroblastos normales embrionarios MRC5. El cebador directo (F) contiene el fragmento Kozak para que sea reconocido por la DNA polimerasa, y ambos cebadores contienen una cola poli-A (8 bases) y las dianas de restricción correspondientes. La amplificación se hace con la Phusion enzyme (FINNZYME) que tiene actividad correctora de errores, siguiendo las siguientes condiciones:

- 1) 10 minutos a 95°C
- 2) 30 segundos a 95°C
- 3) 30 segundos a 65°C
- 4) ciclos 1-20 con 1 minuto de extensión a 72°C
 ciclos 21-30 con 1,5 minutos de extensión
 ciclos 31-37 con 2 minutos de extensión
- 5) 15 minutos a 72°C. En esta etapa se añaden dNTPs, y tampón de reacción a razón de 2 μ l / 100 μ l de reacción, y 0,2 μ l de enzima de forma que contrarreste la actividad exonucleasa.

6) mantener a 4°C

El producto de amplificación se resolvió por electroforesis en un gel de agarosa al 0,7% a 100V. La banda situada al tamaño esperado se corta y se purifica el ADN.

De acuerdo con el sitio de clonaje múltiple del vector (MCS), las enzimas de restricción para llevar a cabo el clonaje fueron XhoI (Takara), y XmaI (New England Biolabs). Cada una requiere un tampón de reacción específico, por lo que el plásmido se cortará en dos reacciones independientes.

-Primera digestión: 2 horas a 37°C

5 µl de vector (4 µg)

1 µl de Tritón

1 µl de BSA 10X

1 µl de tampón de reacción 10X

2 µl de XhoI (40 U)

1 µl de agua destilada

-Segunda digestión: 2 horas a 37°C

10 µl de la primera digestión

6 µl de BSA 10X

6 µl de tampón de reacción 10X

3 µl de XmaI (40 U)

35 µl de agua destilada

La ligación del vector cortado y el inserto se hace durante la noche (o/n) a 4°C con la enzima T4 ligasa (New England Biolabs, 400.000 U/ µl).

A continuación se transforman bacterias termocompetentes con el producto de ligación, siguiendo el protocolo ya mencionado, y se plaquean en placas de agar con kanamicina, de forma que únicamente crezcan aquellas bacterias que hayan incorporado el vector.

Para comprobar que el clonaje ha ido bien, se establecen tres puntos de control:

1) PCR directa de colonias. Empleando el cebador F del promotor del vector, y un cebador R interno, y usando la misma estequiometría ya mencionada. Como molde, se resuspenden 15 colonias en 15 µl de agua, usando 1,5 µl para la PCR. De esta forma se asegura que el inserto se haya ligado con el vector, y de que lo haya hecho en el sentido correcto. Aquellas colonias que resulten positivas se expanden en cultivo en SOC a 37°C o/n y se hace miniprep.

2) Mapa de restricción. El ADN extraído de las minipreps se digiere con las enzimas que se han usado en el clonaje, y se resuelve el producto por electroforesis en un gel de agarosa. La obtención de las bandas en los tamaños esperados confirma el correcto desarrollo del protocolo. A continuación se hace maxiprep empleando el Plasmid Maxi kit (QIAGEN), siguiendo las indicaciones del fabricante, y se purifica el vector de expresión listo para su uso. El vector vacío se purificó siguiendo los mismos pasos para utilizarlo como control.

3) Secuenciación del inserto. Para comprobar la fidelidad de la amplificación del ADNc, se diseñan cebadores internos que permitan la secuenciación de fragmentos de 400 pb consecutivos y solapantes, desde el principio al final del inserto, descartando así la presencia de mutaciones u otras alteraciones en su secuencia.

Los vectores ARN-sh se chequean por secuenciación, de modo que la secuencia coincida con la indicada por la casa comercial, utilizando cebadores complementarios a la región promotora del vector. Se proporcionaron 4 vectores ARN-sh con actividad contra CDH11, y un vector con secuencia no complementaria con ningún transcrito humano y que se usó como vector control. A continuación se hizo maxiprep de cada uno por separado y se purificaron.

La transfección de los vectores en las líneas celulares se realizó por electroporación en tubos específicos (Bio-Rad). Las condiciones empleadas fueron 0,25 kV/0,95 µF. Tras unos segundos, se recupera el producto viscoso y se añade a una placa de 150 mm con medio atemperado. La selección de las células que hayan incorporado el vector se hace añadiendo antibiótico al medio frente al cual confiere resistencia el vector. Para seleccionar clones de expresión se empleó G418 a 500 µg/ml durante 2-3 semanas; y los de silenciamiento con ARN-sh, con puromicina a 1 µg/ml. Los niveles de re-expresión y silenciamiento se midieron por western-blot y q-RTPCR, siguiendo los protocolos previamente indicados.

5.3 Ensayos de proliferación celular

Los niveles de proliferación celular se midieron con el ensayo MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) durante 5 días partiendo de 1.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos, y contando con media placa por condición y día de medición. Para medir la proliferación celular en cada punto, se añade 1/10 parte del volumen de MTT a 5 mg/ml, y se incuba durante 3 horas a 37°C. Después se desecha el medio y se sustituye por 100 µl de DMSO (dimetil sulfóxido) que disuelve el colorante. El valor de proliferación celular es proporcional a la medida por colorimetría a 595 nm.

5.4 Ensayos de formación de colonias

Este ensayo informa sobre la capacidad tumorigénica de las células. El protocolo empleado está basado en el publicado por (Franken NA et al., 2006). Se sembraron 1.000 células en placas de 6 pocillos y se mantuvieron en medio de selección durante 2 semanas. Una vez concluido, las células se fijaron y tiñeron con MTT, y aquellas colonias con un diámetro superior a 1 mm fueron cuantificadas con el programa GeneSync®. Los experimentos compararon en paralelo la capacidad tumorigénica de los clones de expresión y silenciamiento frente a sus respectivos controles, y los resultados proceden de réplicas biológicas independientes.

5.5 Ensayos de invasión celular

Para medir *in vitro* el potencial invasivo de las líneas celulares se utilizó el kit QCM ECMatrix Cell Invasion Assay, 24-well (8 µm) (Millipore) colorimétrico, siguiendo las indicaciones del fabricante. Para cada ensayo se cultivaron 200.000 células en la parte superior de la cámara, y se mantuvieron durante 48 horas. Pasado este tiempo, las células se fijaron y tiñeron con cristal violeta, y se cuantificaron los resultados disolviendo el tinte en ácido acético al 10% en agua, y midiendo la absorbancia a 565 nm. De nuevo, la capacidad invasiva se midió comparando los clones positivos con los controles, y aceptando los valores de absorbancia como directamente proporcionales al número de células que han sido capaces de degradar el matrigel e invadir a través de la membrana de policarbonato.

6 Experimentos con modelos animales

Con el fin de confirmar los resultados obtenidos *in vitro*, se llevaron a cabo experimentos en ratones desnudos inmunocomprometidos (Harlan Laboratories). Los ratones empleados eran machos de 5 semanas que se mantenían de acuerdo con los estándares de bioseguridad definidos en los protocolos normalizados del animalario de

ICO-IDIBELL, y se manipulaban siguiendo los criterios aprobados por el comité ético del centro.

6.1 Inyección subcutánea

Se inyectaron subcutáneamente $3 \cdot 10^6$ de células control o transfectadas con el vector de expresión o silenciamiento de CDH11, diluidas en 200 μ l de PBS, en ambos flancos de cada animal (n=8/condición) para estudiar el crecimiento tumoral. Cada 5 días se midió la anchura (A) y la longitud (L) del tumor. Los ratones se sacrificaron 21 días después de la inyección y se separaron y pesaron los tumores de cada grupo.

5.6.2 Inyección intravenosa

Para medir el potencial metastático de las líneas celulares manipuladas, se inyectaron $1,5 \cdot 10^6$ células control o transfectadas con los vectores de expresión o silenciamiento de forma intravenosa (por la vena de la cola), diluidas en 200 μ l de PBS (n=12 para cada condición). Los ratones se sacrificaron 30 días después de la inyección y se estudió la presencia de metástasis hepáticas y pulmonares. La presencia de micrometástasis se estudió por tinción con hematoxolina-eosina.

5.6.3 Desarrollo de modelos animales ortotópicos

Con el fin de analizar el potencial metastático de las células en un modelo que recapitulase el entorno fisiológico de las líneas celulares (SIHN-011B, de cáncer de cabeza y cuello), se desarrolló un modelo ortotópico de cáncer de cabeza y cuello. Se recogieron 200.000 células transfectadas con el vector vacío y el vector de expresión, y se inyectaron en la lengua de ratones atímicos nu/nu de 5 semanas (n=15). Previamente, los ratones fueron anestesiados por inhalación de isoflurano. Al cabo de 15 días los ratones fueron sacrificados. Para visualizar los ganglios se inyectaron 50 μ l de azul de metileno en la lengua, y pasados 20 minutos, éstos quedaban teñidos y se extrajeron para su estudio patológico, junto con hígado y pulmones.

6. Análisis bioestadístico

Para el análisis bioestadístico de los datos se utilizó el programa GraphPad Prism5. Para comparar medias se utilizó el test de t-Student (para un $n \geq 10$) aplicando estadística paramétrica, y de U-Mann Whitney en caso aplicar estadística no paramétrica. Para comparar frecuencias se utilizó el test exacto de Fisher.

RESULTADOS

1. Procesos de inactivación epigenética asociados a metástasis

1.1 Inactivación transcripcional por hipermetilación del ADN en la progresión metastásica de melanoma y cáncer de cabeza y cuello

Con el fin de identificar aquellos genes cuya inactivación epigenética contribuyese al fenotipo invasivo, analizamos los perfiles de metilación de líneas celulares pareadas, derivadas de tumor primario y metástasis del mismo paciente. Estas líneas representan dos tipos tumorales de gran incidencia: melanoma –líneas IGR39 e IGR37–, y cáncer de cabeza y cuello –SIHN011A y SIHN011B.

Los patrones de metilación obtenidos permitieron conocer el estado de metilación de 1.505 sitios CpG localizados entre -1.500 y +800 bases entorno al inicio de transcripción, de 808 genes distribuidos en todos los cromosomas a excepción del cromosoma Y. Los genes examinados en el *microarray* son oncogenes, genes supresores tumorales, genes imprintados, y genes implicados en funciones de reparación del ADN, control de ciclo celular, metástasis, diferenciación y apoptosis. Entre todas las sondas, el 69% (n= 1.044) se localizan en islas CpG canónicas, mientras que el 31% restante (n= 461) lo hacen fuera de éstas.

Un análisis no supervisado de grupos de los perfiles de metilación del ADN obtenidos (**Figura 7**), demostró que cada tipo tumoral presentaba perfiles de metilación característicos. Asimismo, quedó patente que las líneas metastásicas son más parecidas a los tumores primarios de los que surgieron que entre ellas. No obstante, los perfiles de metilación de las líneas metastáticas presentaban diferencias de metilación del ADN con respecto a sus respectivos tumores. Analizando cada pareja de líneas por separado se identificaron numerosos genes diferencialmente metilados asociados a metástasis. Aunque no nos centramos en la caracterización de cambios individuales, llevamos a cabo un análisis global de los cambios de metilación asociados a la progresión metastásica. Analizando de forma conjunta los eventos de hipermetilación del ADN, se identificaron 101 genes con ganancia de metilación superior al 50%. Mediante un análisis de ontología génica (GO), se constató la hipermetilación de genes implicados en procesos relacionados con control de proliferación, apoptosis, adhesión celular y programas de desarrollo (**Tabla s5**, Anexo 1).

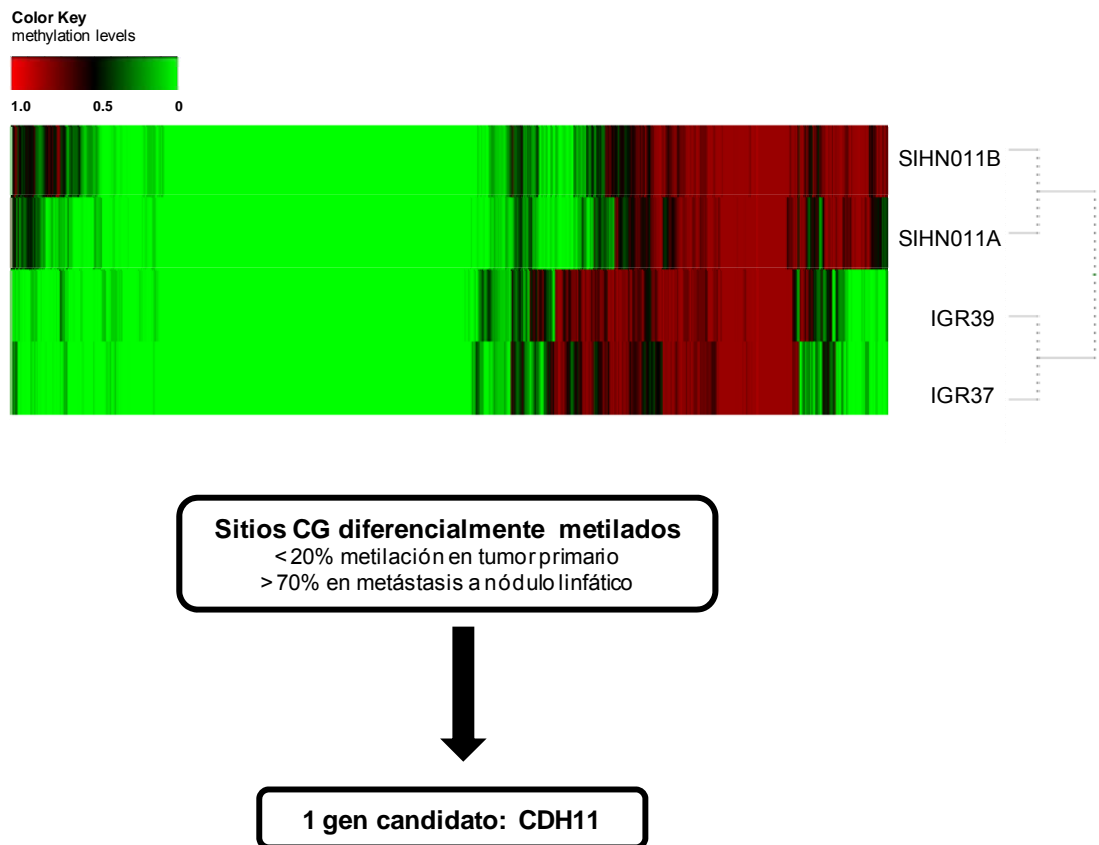


Figura 7: Selección de genes candidatos mediante análisis no supervisado de los perfiles de metilación del ADN. Análisis de los perfiles de metilación del ADN de los 1.505 sitios CG en líneas pareadas de tumor primario y metástasis, derivadas de melanoma (IGR39/IGR37) y cáncer de cabeza y cuello (SIHN011A/SIHN011B); y selección de genes candidatos.

1.2 Silenciamiento transcripcional de *CDH11* por hipermetilación de su región promotora

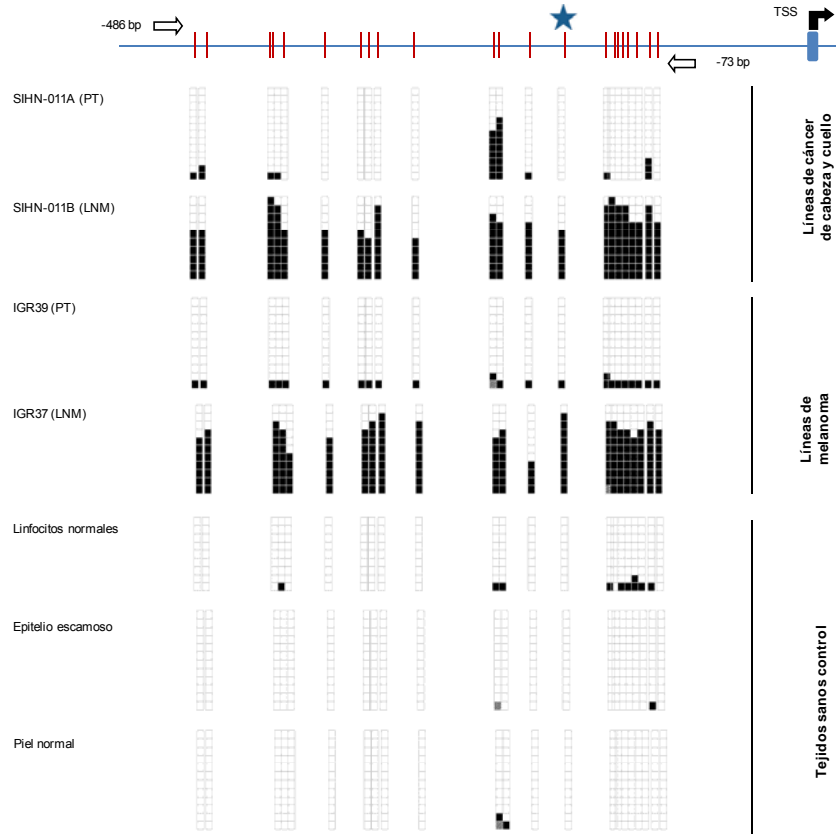
A pesar de que para cada tipo tumoral se encontraron numerosas sondas que distinguían cada tumor primario de su metástasis, nos interesaba encontrar genes que presentasen un patrón común de inactivación epigenética en las metástasis de ambos tipos tumorales (**Figura 7**). Para la selección de candidatos establecimos criterios: (1) sitios CpG con cambios superiores al 50% de metilación entre el tumor primario y la metástasis; (2) el cambio afectase al inicio de transcripción (TSS \pm 350bp); (3) dicho cambio debía darse en ambos modelos (melanoma y cabeza y cuello). La aplicación de estos criterios resultó en un único gen codificante: caderina-11 (*CDH11*). Los datos del *microarray* mostraban que *CDH11* presentaba un sitio CpG localizado en la isla CpG asociada a su región promotora 5' (en posición -173 pb), que se hipermetilaba en las líneas metastáticas IGR37 y SIHN011B pero permanecía no metilado en las del tumor primario IGR39 y SIHN011A. Dada la existencia de estudios previos acerca de la función de *CDH11* en cáncer, decidimos caracterizar funcionalmente los efectos de la hipermetilación de su promotor en la progresión metastática (**Figura 7**).

Para validar los resultados del *microarray* de metilación, aplicamos secuenciación genómica por bisulfito sódico para analizar el promotor de *CDH11* en las líneas estudiadas. Tal como se esperaba, encontramos elevados niveles de metilación del ADN en las líneas metastáticas, IGR37 y SIHN011B, y prevalencia de clones no metilados en las líneas de tumor primario, IGR39 y SIHN011A. La presencia de clones metilados en ambas líneas primarias nos hizo pensar que éstos podrían ser las poblaciones fundadoras de los focos metastáticos. La secuenciación de los tejidos normales correspondientes, epitelio oral escamoso y piel sana, así como de linfocitos normales, mostró un perfil no metilado de la isla CpG presente en el promotor de *CDH11* (**Figura 8 A**).

Para estudiar el efecto del aumento de la metilación del ADN en la isla CpG del promotor de *CDH11* sobre su actividad transcripcional, medimos los niveles de expresión de ARN y proteína por RT-PCR cuantitativa y western blot, respectivamente (**Figura 8 B**). La expresión de *CDH11* resultó indetectable –o a niveles mínimos– en las líneas metastáticas con el promotor del gen hipermetilado, mientras que ésta era alta y similar en las líneas de tumor primario y los tejidos normales usados como control. La conexión funcional entre expresión y metilación quedó reforzada por el

empleo de inhibidores de la metilación del ADN; la expresión de caderina-11 quedó restablecida a nivel de ARN y proteína al tratar las células metastáticas con el fármaco demetilante 5-aza-2'-deoxicitidina (5-AZA) (**Figura 8 B**).

A



B

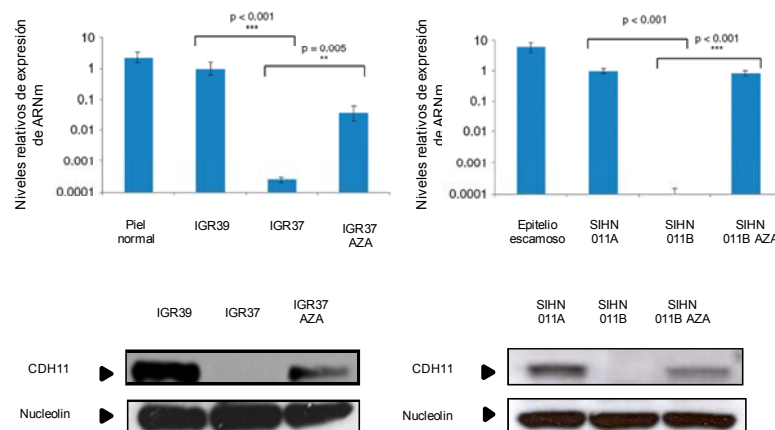


Figura 8: Silenciamiento transcripcional de Caderina-11 por hipermetilación de su promotor. (A) Secuenciación genómica de bisulfito en la región promotora de *CDH11* en las líneas y tejidos estudiados. Un mínimo de 8 clones se secuenciaron en cada muestra (negro, metilado; blanco, no metilado). Los sitios CG están representados por líneas verticales, y la flecha negra marca el inicio de transcripción (TSS). La estrella marca la posición de la sonda en el array de metilación. **(B)** Cuantificación de la expresión de *CDH11* a nivel ARNm por RT-PCR cuantitativa y proteína mediante Western-blot. Los

niveles de expresión representan como media de réplicas independientes y su desviación estándar, y la significancia estadística resulta de test de t-Student.

1.3 El restablecimiento de la expresión de caderina-11 atenúa el fenotipo metastásico

Una vez comprobado el efecto de la hipermetilación del promotor de *CDH11* en metástasis sobre su expresión, quisimos investigar si este suceso favorece el fenotipo metastático *in vitro* e *in vivo*. Se transfectaron las células metastáticas SIHN011B con un vector de expresión de caderina-11 (pEGFP-IRES-CDH11), y se midió la eficiencia de transfección por western-blot (**Figura 9 A**). A nivel fenotípico, las células transfectadas con el vector, SIHN011B-CDH11 presentaron menor tasa de proliferación y formación de colonias que las células transfectadas con el vector vacío, SIHN011B-Mock (**Figura 9 B-C**). La capacidad de invasión se vio igualmente reducida al recuperar la expresión de CDH11 en la línea metastásica, tal como resultó de los experimentos con cámaras Boyden recubiertas con matrigel (**Figura 9 D**). Para evaluar el fenotipo *in vivo*, se llevaron a cabo varios ensayos en ratones desnudos atímicos (**Figura 9 E-G**). En primer lugar, tres millones de células se inyectaron bajo la piel de la espalda, y se comparó el crecimiento tumoral subcutáneo de las células SIHN011B-CDH11 y SIHN011B-Mock a lo largo de 30 días. Con el fin de evaluar la influencia del nivel de expresión de CDH11 en el fenotipo celular, se seleccionaron dos clones con distintos niveles de expresión de la proteína (**Figura 9 A**). Al finalizar el ensayo, los tumores originados por las células transfectadas con caderina-11 presentaban un menor peso y volumen que los formados por las células control (**Figura 9 E**). Asimismo, evaluamos la capacidad de ambas líneas para formar metástasis en nódulos linfáticos utilizando un modelo ortotópico de cáncer de cabeza y cuello. Comprobamos que las células SIHN011B-CDH11 inyectadas en la capa submucosa de la lengua de los ratones atímicos desarrollaban un menor número de metástasis en los nódulos linfáticos adyacentes, en comparación con la línea celular control (**Figura 9 F**). La capacidad de diseminación sistémica se midió por inyección intravenosa de las células a través de la vena de la cola. Las células SIHN011B-Mock producían numerosos focos metastáticos en los pulmones, mientras que se observaba una notable reducción en los experimentos con el mismo número de células SIHN011B-CDH11 inyectadas (**Figura 9 G**), confirmando el papel de la caderina-11 en el fenotipo metastático.

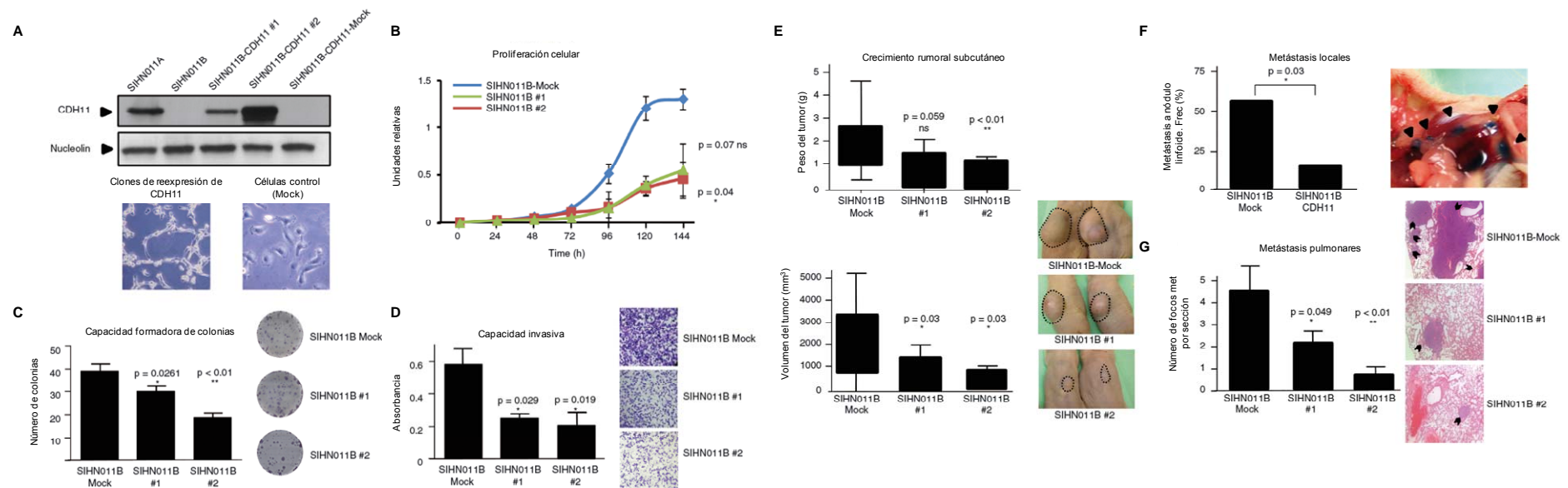


Figura 9: Capacidad supresora de metástasis de Caderina-11 (A) La secuencia codificante de CDH11 se clonó en un vector pEGFP-IRES de forma estable. Se seleccionaron dos clones (SIHN011B #1 y SIHN011B #2) en comparación con el control (Mock). (B) Niveles de proliferación entre los clones de reexpresión de CDH11 y el control se determinaron mediante ensayos de MTT. (C) La capacidad tumorigénica se evaluó contando el número de colonias formadas al cabo de dos semanas partiendo de 1.000 células en placas de 35 mm. (D) La capacidad invasiva se midió en cámaras Boyden recubiertas de Matrigel. Se contaron las células 48 h después de sembrarlas. Las imágenes muestran campos representativos de la membrana a magnificación 20X. (E) Los clones de reexpresión de Caderina-11 y con el vector vacío, se inyectaron en los flancos de ratones desnudos inmunodeprimidos, y se evaluó su crecimiento a lo largo de 3 semanas. Las imágenes muestran el crecimiento a tiempo final. (F) Evaluación de la capacidad metastásica local en un modelo ortotópico de cabeza y cuello. Las flechas marcan los nódulos linfáticos. (G) Evaluación de la capacidad metastásica a pulmón tras inyección de los clones y el control por la vena de la cola. Las imágenes muestran secciones de los pulmones teñidos con hematoxilina-eosina; las flechas indican presencia de nódulos metastásicos. Valores promediados \pm desviación estándar; p-valores test t-Student.

1.4 La pérdida de caderina-11 en el tumor primario favorece la progresión tumoral

Así como el restablecimiento de caderina-11 en las líneas metastáticas atenúa el fenotipo metastático, su inactivación permanente en las células del tumor primario produce el efecto contrario. Para recapitular el efecto del silenciamiento epigenético de CDH11 en el tumor primario, transfectamos la línea derivada del tumor primario SIHN011A con vectores de expresión estable de ARN de interferencia (shRNA) contra la secuencia de la caderina-11(SIHN011A-57/5) y una secuencia control (SIHN011A-Scb). Tras confirmar la eficiencia de transfección mediante western-blot (**Figura 10 A**), evaluamos los mismos parámetros que medimos en la línea metastática. Constatamos un aumento muy significativo de la proliferación celular *in vitro*, así como mayor capacidad tumorigénica, tal como indicaron los ensayos de MTT y de formación de colonias (**Figura 10 B-C**). Los experimentos de invasión en cámaras Boyden cubiertas de matrigel demostraron que las células SIHN011A-57/5 presentaban una mayor capacidad invasiva que las SIHN011A-Scb (**Figura 10 D**), atribuible al silenciamiento de CDH11.

Para corroborar los resultados obtenidos *in vitro*, trasladamos los ensayos al modelo *in vivo* con ratones atímicos desnudos. Los tumores formados en la espalda de los ratones tras la inyección subcutánea de las células SIHN011A-57/5 presentaban un mayor volumen que los originados por las células SIHN011A-Scb control (**Figura 10 E**). Para evaluar la capacidad de diseminación sistémica y formación de metástasis distales, medimos la formación de metástasis pulmonares por inyección intravenosa de la línea SIHN011A-57/5 frente a su control SIHN011A-Scb (**Figura 10 F**). La línea con caderina-11 silenciada, SIHN011A-57/5, era capaz de generar un mayor número de nódulos metastáticos en los pulmones, y de mayor tamaño, que los producidos por inyección de la línea control SIHN011A-Scb.

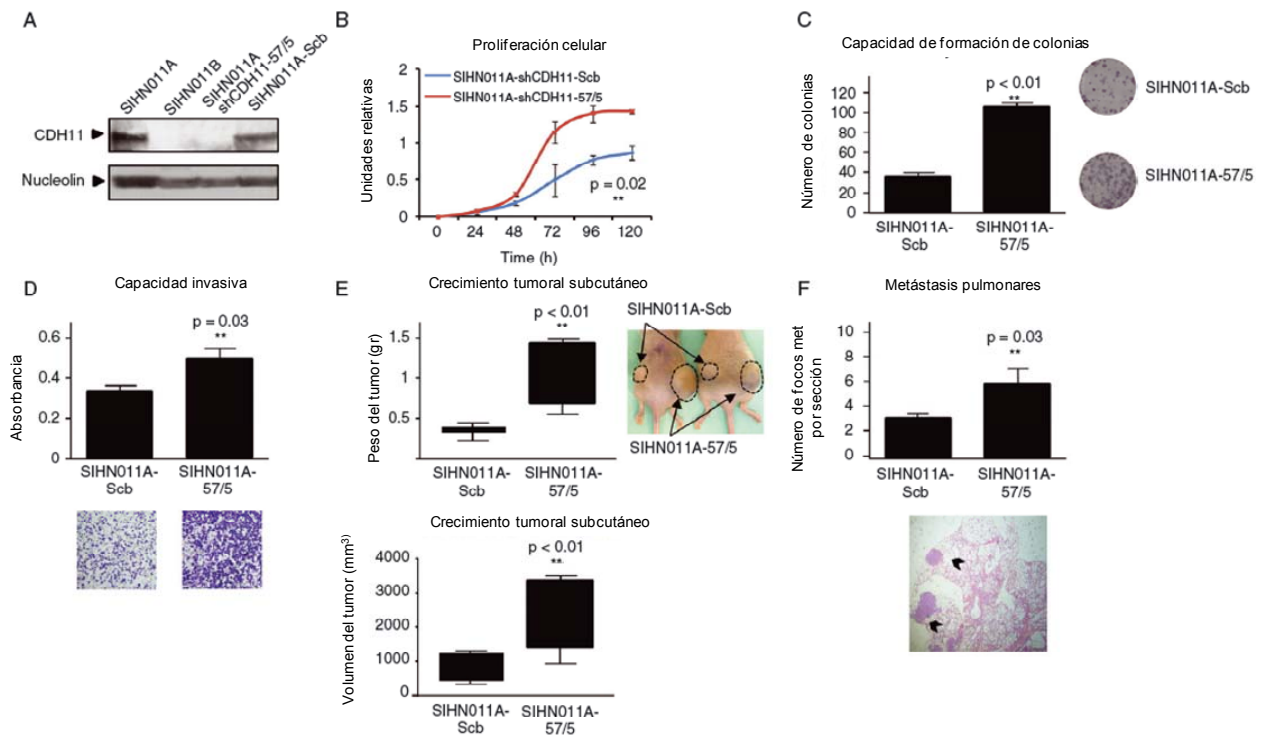


Figura 10: El silenciamiento de CDH11 favorece la diseminación metastásica. (A) Eficiencia de interferencia de CDH11 medida por western-blot en las células derivadas de tumor primario (SIHN011A-57/5). (B) Niveles de proliferación entre el clon SIHN011A-57/5 y el control SIHN011A-Scb mediante ensayos de MTT. (C) La capacidad tumorigénica se evaluó contando el número de colonias formadas al cabo de dos semanas partiendo de 1.000 células en placas de 35 mm. (D) La capacidad invasiva se midió en cámaras Boyden recubiertas de Matrigel. Se contaron las células 48 h después de sembrarlas. Las imágenes muestran campos representativos de la membrana a magnificación 20X. (E) Crecimiento tumoral subcutáneo de las células SIHN011A-57/5 interferidas y el control. Las imágenes muestran el crecimiento a tiempo final. (F) Evaluación de la capacidad metastásica a pulmón tras inyección de las células SIHN011A-57/5 y el control SIHN011A-Scb por la vena de la cola. Las imágenes muestran secciones de los pulmones teñidos con hematoxilina-eosina; las flechas indican presencia de nódulos metastásicos. Valores promediados \pm desviación estándar; p-valores test t-Student.

1.5 El silenciamiento epigenético de la caderina-11 se observa en pacientes de melanoma y cáncer de cabeza y cuello asociado a diseminación metastásica

La hipermetilación de la isla CpG localizada en el promotor de *CDH11* no es una característica aislada de las líneas estudiadas. Para valorar la relevancia clínica de este fenómeno, analizamos el ADN de muestras primarias procedentes de pacientes afectados por los tipos tumorales investigados. En las muestras estudiadas observamos hipermetilación del promotor de *CDH11* en un 16% (8 de 51) y un 19% (13 de 68) de las muestras de cáncer de cabeza y cuello y melanoma, respectivamente. No obstante, la evidencia más ilustrativa en relación a la inactivación epigenética de *CDH11* asociado a metástasis vino al clasificar las muestras en función de su estadio: en un 92% (12 de 13, test exacto de Fisher, $p = 0.0017$) y 88% (7 de 8, $p = 0.022$) de los casos, la hipermetilación de *CDH11* se observaba en muestras de metástasis a nódulo linfático en los pacientes de cáncer de cabeza y cuello y melanoma, respectivamente, ocurriendo en tumor primario en el resto de los casos (**Figura 11 A**). En aquellos casos en que contamos con muestras pareadas, primario y metástasis, del mismo paciente, observamos que la hipermetilación de la caderina-11 se daba prevalentemente en las metástasis y no en el tumor primario (**Figura 11 B**). Al igual que se observaba en las líneas (**Figura 8 A**), la secuenciación de estos tumores primarios evidenció la presencia de clones metilados a partir de los cuales se pudo haber originado la metástasis (**Figura s1 Anexo 1**).

Finalmente, analizamos la expresión de caderina-11 por inmunohistoquímica en 4 de los pacientes de cáncer de cabeza y cuello en que se analizó el estado de metilación del promotor génico (**Figura 11 C**). La presencia de hipermetilación del promotor de caderina-11 se asoció a pérdida de expresión, mientras que aquellas muestras que mostraban niveles de metilación más bajos denotaban mayores niveles de expresión proteica.

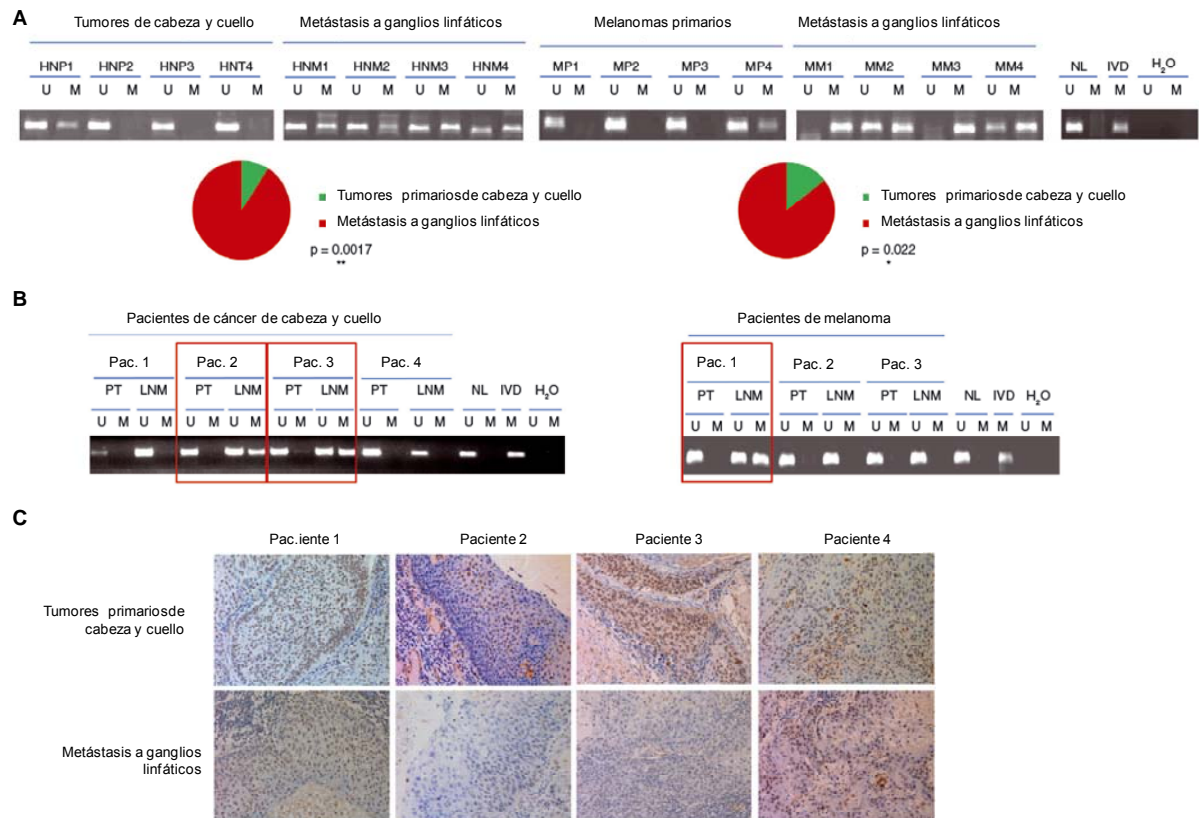


Figura 11: La inactivación epigenética de *CDH11* ocurre predominantemente en metástasis. (A) El análisis por PCR específica de metilación en ADN extraído de muestras de pacientes de melanoma y cáncer de cabeza y cuello, indica que *CDH11* se hipermetila preferencialmente en metástasis en comparación con las muestras de tumor primario, en ambos tipos tumorales, tal como muestran los gráficos de sectores. (B) En casos pareados de tumor primario y metástasis a ganglio linfático se observa la hipermetilación del promotor de *CDH11* en las muestras procedentes de metástasis a ganglios linfáticos. (C) Análisis de expresión de *CDH11* por inmunohistoquímica en cortes histológicos de los pacientes 1-4 de los que se disponía de muestras pareadas. La expresión de *CDH11* se pierde en las metástasis de los pacientes 2 y 3 (*CDH11* hipermetilada en metástasis), mientras que no varía en los pacientes 1 y 4. U, no metilado; M, metilado; NL, control de "no metilación" linfocitos normales; IVD, "control metilación" ADN metilado *in vitro*; HNP, tumor primario de cabeza y cuello; HNM, metástasis; MP, melanoma primario; MM, melanoma metastásico; PT, tumor primario; LNM, metástasis a ganglio linfático.

2. Análisis de las alteraciones en la metilación del ADN en la progresión del melanoma cutáneo

2.1 Dinámica de los patrones de metilación del ADN en la progresión del melanoma

Con el fin de ver la distribución de las muestras analizadas en base a sus patrones de metilación se realizó un análisis de componentes principales (PCA). Como se observa, las muestras benignas se agrupan en su mayoría al margen de las muestras de melanomas primarios y metástasis que presentan una mayor heterogeneidad en su distribución (**Figura 12**).

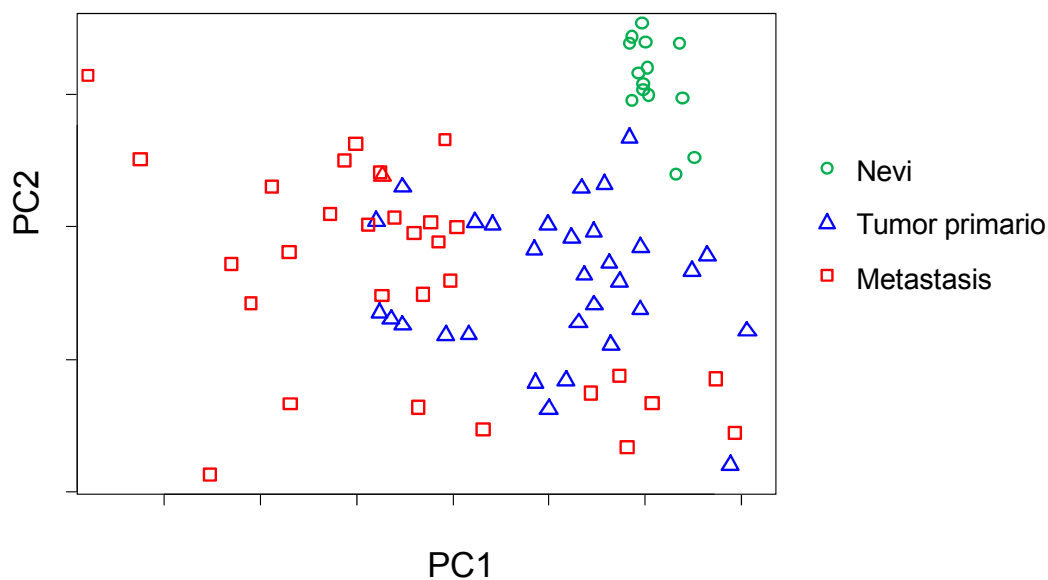


Figura 12: Análisis de componentes principales de todas las muestras incluidas en el estudio.

Se aplicó un análisis de *Random Forest* supervisado en comparaciones dos a dos, con el fin de identificar las sondas de metilación con mayor poder discriminatorio entre las 75 muestras, que permitan identificar los cambios de metilación más consistentes entre cada grupo. El agrupamiento de las muestras empleando esta selección de sondas evidencia la capacidad de los perfiles de metilación para clasificar las muestras en función de su estadio. En la figura se observan tres ramas: la central enriquecida en muestras de *nevi*, y las otras dos en muestras de melanomas primarios y metástasis, respectivamente (**Figura 13**). La muestra clasificada como melanoma que se agrupa con las muestras control es un melanoma de estadio temprano y crecimiento radial que se desarrolló a partir de un *nevus*. El mayor grado de mezcla entre muestras de melanoma primarios y metástasis, refleja por un lado la

heterogeneidad celular característica de este tipo tumoral, y por otro la similitud en los perfiles exhibidos por los estadios tumorales (primarios y metástasis).

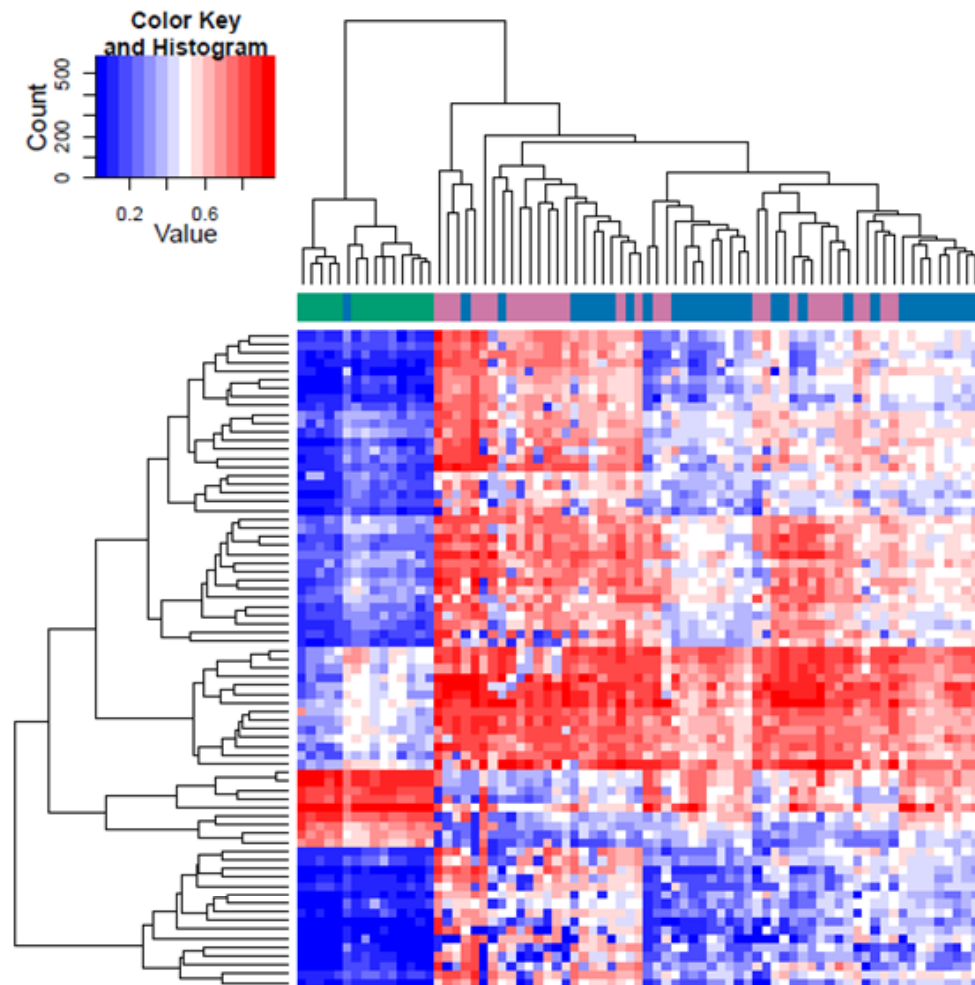


Figura 13: Análisis de agrupamiento de los pacientes de melanoma estudiados en la fase de descubrimiento. Seleccionando aquellas sondas de metilación con mayor poder discriminatorio entre los grupos de muestras, se consigue clasificar las muestras en base a las fases de progresión. Las muestras (verde, nevi; azul, melanomas primarios; rojo, metástasis) se disponen en columnas, y las sondas se agrupan en filas. Los valores de metilación de cada sonda en cada una de las muestras viene indicado por el gradiente entre rojo (metilado) y azul (no metilado).

Con el fin de profundizar en la heterogeneidad presente en los perfiles de los tumores primarios, se hizo un análisis de metilación diferencial no supervisado de los melanomas primarios. El análisis estableció dos grupos formado por melanomas cuya separación mostraba cierto paralelismo con la profundidad Breslow. Los tumores incluidos en este grupo (PT-2) mostraban un índice Breslow superior a 3,5 mm, estando los demás (PT-1) por debajo de este umbral. Mediante un análisis supervisado de ambos grupos, se identificaron 701 sondas correspondientes a 468 genes con cambios de metilación entre grupos estadísticamente significativos ($p < 0.01$)

y superiores al 25% afectando a la región promotora. Entre éstos, se comprobó una mayor incidencia de la hipometilación (76,6% de los cambios) del ADN frente a la hipermetilación (23,4%) (**Figura s4** en Anexo 1), constituyendo todos ellos marcadores de estadios avanzados en la progresión del melanoma. Entre los que mayor ganancia de metilación presentaban se encuentran genes codificantes para proteínas de adhesión (cluster de protocaderinas; *AMIGO2*) ($p= 2,1E-15$) y con dominios "homeobox" (*HOXA11*, *SMX1*, *EVX2*) ($p= 5,2E-3$). En cambio, los genes con mayores pérdidas de metilación en su región promotora están relacionados con percepción sensorial ($p=1,4E-18$) y procesos neurológicos ($p=2,1E-14$) (**Figura s4** en Anexo 1).

Con el fin de identificar biomarcadores de metilación implicados en la progresión del melanoma llevamos a cabo un análisis de metilación diferencial. Las muestras se agruparon en *nevi*, primarios y metástasis, y se calculó el valor mediano de metilación para cada sonda en cada uno de los grupos (DGM), y se ejecutó el test de Mann Whitney (corrección Benjamini Hochberg (BH); $p<0.05$) para identificar aquellos cambios entre grupos que fueran superiores al $DGM>25\%$ de metilación y estadísticamente significativos. Empleando este criterio se identificaron 1.499 sondas hipermetiladas pertenecientes a 646 genes entre los *nevi* benignos y las muestras tumorales (primarios y metástasis), localizadas preferencialmente en islas CpG (66,1%); y 1.229 sondas hipometiladas referentes a 402 genes, sin asociación relevante con islas CpG (11,4%) (test exacto de Fischer, dos colas; $p<0.0001$).

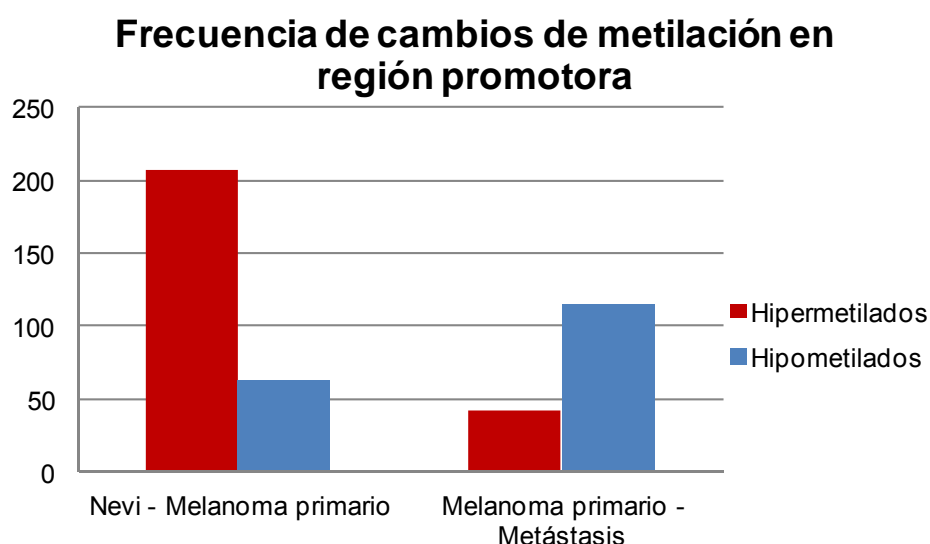


Figura 14: Frecuencia de cambios en la metilación del ADN de promotores en las fases de progresión del melanoma. La hipermetilación de promotores es predominante en fases iniciales de formación del melanoma (77,6%), ocurriendo también en progresión metastática. En términos absolutos,

los eventos de hipometilación de promotores son mayoritarios y se dan en mayor frecuencia (72,6%) en progresión metastásica.

Se observó que la ganancia de metilación era más frecuente en la comparación de *nevi* con melanomas primarios, afectando a 559 genes (86,5%). De éstos, 181 genes presentaban hipermetilación en su región promotora, y todos ellos se encontraron asociados a la presencia de Isla CpG. En progresión metastásica se identificaron 87 genes con sondas que presentaban ganancia de metilación. De éstos, 35 (40,2%) presentaban hipermetilación en su promotor, estando la mitad asociados a isla CpG (Figura 14).

La hipometilación del ADN se vió que afectaba a secuencias de baja densidad en CGs y ocurría más frecuentemente fuera de las regiones promotoras (64%), aunque se identificaron 145 genes con pérdida de metilación en el promotor, 52 de ellos en la transformación a melanoma, y 93 en progresión metastásica. En contraste con la hipermetilación aberrante, la pérdida de metilación se observó en mayor frecuencia en la progresión metastásica (254 genes) que en la melanomagénesis (148 genes) (Figura 15).

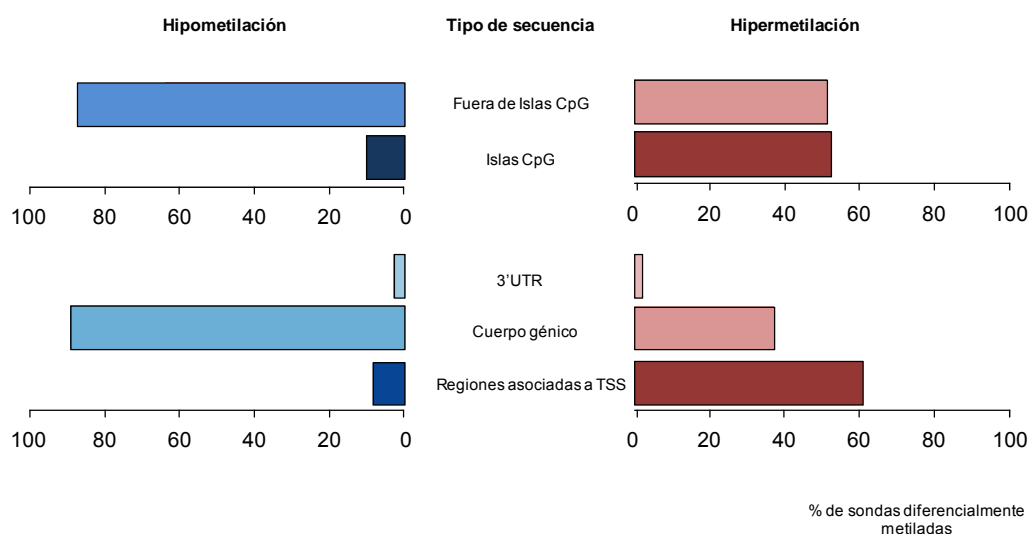


Figura 15: Distribución de las diferencias de metilación en melanoma. Se identificaron las sondas diferencialmente metiladas entre *nevi* y muestras tumorales, y se clasificaron con base al sentido de cambio y al tipo de secuencia afectada.

2.2 Influencia de los cambios de metilación del ADN en la transcripción génica

Con el fin de evaluar la relevancia funcional de las alteraciones en los patrones de metilación previamente descritas, se correlacionaron los cambios observados con bases de datos de expresión génica disponibles en el *Gene Expression Omnibus* (GEO), publicadas en Scatolini et al. 2010 (GSE12391), Riker et al 2008 (GSE7553), y

Xu et al 2008 (GSE7956). Los datos crudos de expresión se analizaron y ajustaron por el método Benjamini-Hochberg. Aquellos cambios de expresión superiores a dos veces el valor de la referencia y con un valor $p < 0.05$ se consideraron significativos. Se pudieron atribuir valores de expresión a 918 de los 1.048 genes diferencialmente metilados, y se obtuvo una correlación negativa significativamente estadística entre cambios de expresión y de metilación para 200 de ellos (20,1%) en al menos una de las bases de datos de expresión analizadas. De éstos, 126 genes (12,6%) presentaban ganancia de metilación y consiguiente pérdida de expresión, y 74 (7,5%) mostraban pérdida de metilación con un aumento asociado de expresión génica.

2.3 Implicaciones funcionales de las alteraciones de metilación de ADN en la progresión del melanoma

Se realizó un análisis de Ontología Génica (GO) empleando la herramienta *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* (DAVID) v6.7, con aquellos genes que mostraban cambios de expresión como consecuencia de las alteraciones en la metilación de sus promotores. Las categorías funcionales asociadas a la pérdida de expresión de los genes hipermetilados convergen en procesos de desarrollo embrionario (*HOXA9*, *HOXA7*, *EMX2*), adhesión (*ANXA9*, *CLDN5*, *LAMA3*) y diferenciación terminal (*OVOL1*, *TBX1*). Por otro lado, la sobre-expresión de genes como resultado de la pérdida de metilación en sus promotores afecta de manera prevalente a procesos de inmunidad (*CCR1*, *CCR7*, *TLR4*, *S100A1*), e inflamación (*C1QB*, *C3AR1*, *PARAP1*, *PTPR*) (corregido por BH; $p < 0.05$) (**Figura 16 A-B**).

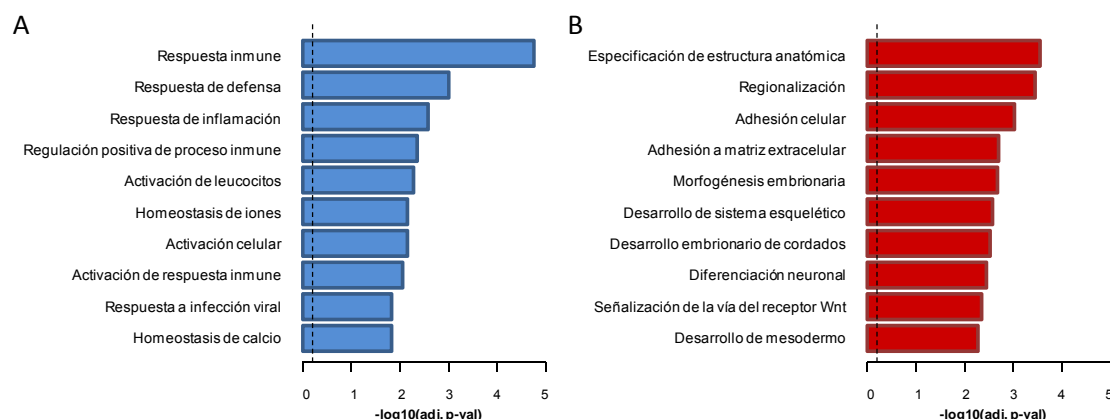


Figura 16: Relevancia funcional de los cambios de metilación del ADN en melanoma. Considerando los cambios de metilación que inducen diferencias transcripcionales, se hizo un análisis de ontología génica para los genes **(A)** hipermetilados y con expresión reprimida, y **(B)** hypometilados y con expresión aumentada.

2.4 Biomarcadores del metilación con valor diagnóstico

Las sondas diferencialmente metiladas de manera más consistente entre los nevi y los melanomas primarios y metástasis cutáneas se identificaron mediante un análisis *Random Forest* comparando ambos grupos (normal y tumoral). Ambos grupos se diferenciaban por los cambios producidos en 25 sondas pertenecientes a 14 genes, entre los que se observó frecuentes cambios en los promotores de *PAX6*, *SALL4* y *PRAME*. Con el fin de testar su capacidad diagnóstica para diferenciar nevi benignos de melanomas, se calculó el área bajo la curva (AUC).

2.5 Validación de los cambios de metilación del ADN asociados a la progresión del melanoma

A continuación se identificaron genes cuyos cambios de metilación pudieran estar ligados a la progresión del melanoma. Los criterios para la selección de genes candidatos para su validación atendieron a (i) presentar diferencias superiores a $DGM \geq 25\%$ en las comparaciones realizadas entre grupos; y (ii) que los cambios de metilación observados estuviesen negativamente correlacionados con cambios en la expresión génica de las bases de datos analizadas. Siguiendo estos criterios, seleccionamos los genes *TFAP2B*, *HOXA9* y *AKT3*. Asimismo incluimos el gen *TWIST1* ya que resultó el candidato con mayor puntuación en nuestra clasificación de marcadores, y se detectó diferencialmente metilado en 4 bases de datos independientes de metilación del ADN reanalizadas para este estudio. Se procedió a una primera etapa de validación técnica mediante pirosecuenciación con el fin de comparar los resultados obtenidos por ambas técnicas. Un análisis de correlación comparando los datos obtenidos en el array de metilación y por pirosecuenciación en las mismas muestras demostró la utilidad de la técnica empleada para validar los resultados, así como la fiabilidad del array de metilación. Los índices de correlación entre los datos del array, y de pirosecuenciación para los genes seleccionados fueron *TFAP2B* ($r=0.7$; $p<0.001$), *HOXA9* ($r=0.74$; $p<0.001$), *TWIST1* ($r=0.65$; $p<0.001$), y *AKT3* ($r=0.7$; $p<0.001$) (**Figura s2** en Anexo 1).

Con el fin de evaluar la validez de los resultados obtenidos, los cambios de metilación de los candidatos seleccionados fueron cuantificados en cohortes de muestras independientes provistas por la Universidad Católica de Leuven (Bélgica) (VC-1), Universidad de Maastricht (Países Bajos) (VC-2), Universidad de Uppsala (Suecia) (VC-3). Los cambios de metilación observados en la cohorte de descubrimiento mantuvieron significancia estadística en al menos una de las cohortes de validación examinadas. El gen *TWIST1* resultó altamente significativo en las tres cohortes

(Kruskal-Wallis (KW); $p < 0.01$); en dos cohortes se mantuvo significativo *TFAP2B* (KW; $p < 0.01$); y en una de ellas *HOXA9* (KW; $p = 0.01$) y *AKT3* (KW; $p < 0.01$) (**Figura 17**).

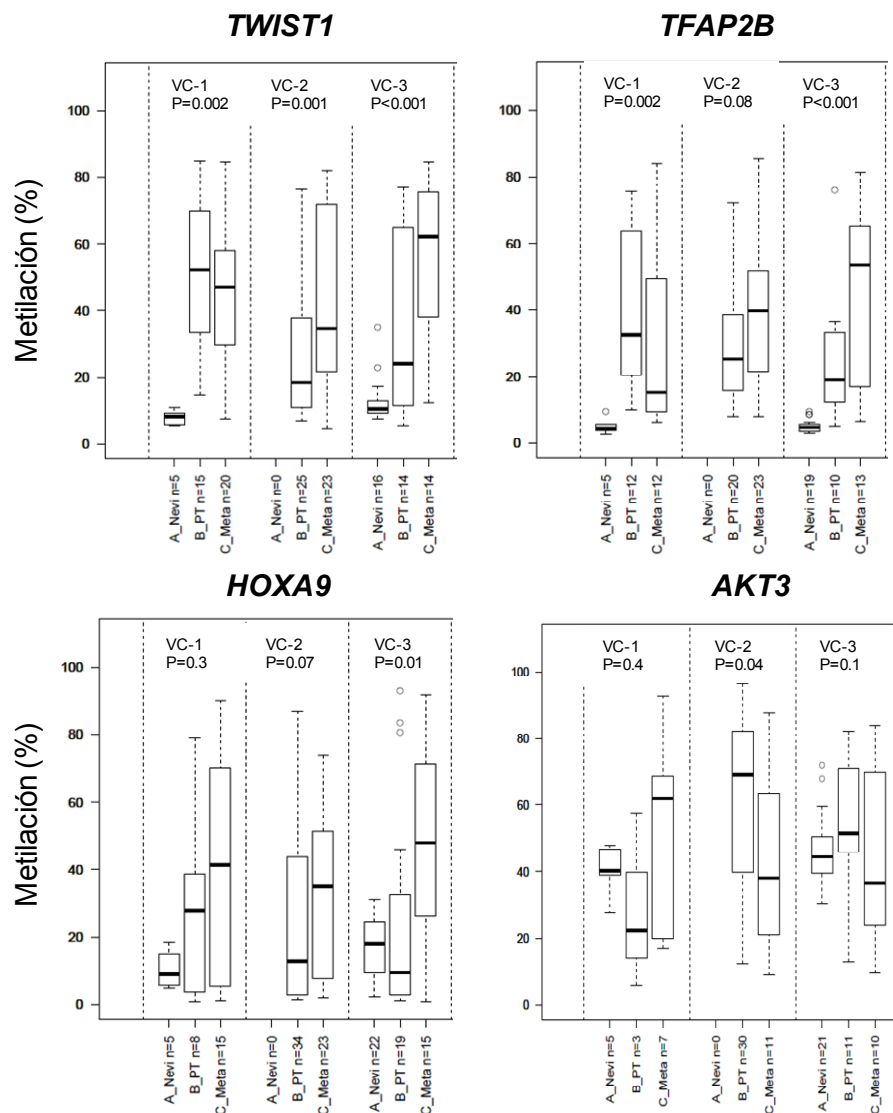


Figura 17: Validación de marcadores epigenéticos en la progresión del melanoma cutáneo. Mediante pirosecuenciación de los genes seleccionados en la cohorte de descubrimiento, se validaron las diferencias de metilación en tres cohortes (VC-1, VC-2, VC-3) de pacientes independientes.

2.6 La metilación del ADN como factor pronóstico

Para identificar biomarcadores de metilación con potencial predictivo, se agruparon los melanomas primarios de la fase de descubrimiento estableciendo un punto de corte en la supervivencia de 4 años, tal como se ha empleado en estudios previos (Winnepnickx V et al, 2006). Aquellos pacientes que fallecieron antes se definieron como de mal pronóstico, mientras que los que superaron los 4 años tras el diagnóstico se denominaron de buen pronóstico. Mediante un análisis *Random Forest* supervisado

se aislaron las sondas con metilación diferencial, estableciendo el punto de corte en DGM=25% (BH; $p<0.05$) entre ambos grupos (**Figura s3** en Anexo 1). Con este criterio se identificaron 1.088 sondas, de las cuales 654 correspondían a la región promotora de 328 genes. Las sondas identificadas se ordenaron en base a su significancia, al número de sondas presentes en cada gen, y a la diferencia entre ambos grupos, y se seleccionaron *NASS1* ($p= 3.84E-05$), *JMT1* ($p= 4.40E-06$) y *ABM1* ($p= 3.88E-05$). Para evaluar su potencial predictivo se pirosecuenció la región contenedora de las sondas identificadas en una cohorte independiente compuesta por melanomas primarios ($n=85$) de todos los estadios (Universidad de Lund, Suecia), y se llevaron a cabo análisis de regresión Cox teniendo en cuenta el tiempo de supervivencia, el índice Breslow asociado a cada tumor, y la presencia de ulceración. En esta cohorte de validación, *NASS1* ($p<0.001$), *JMT1* ($p<0.01$) y *ABM1* ($p<0.001$) se validaron como biomarcadores pronósticos de supervivencia a melanoma independientes de otros factores pronósticos usados en clínica. Asimismo, mediante un análisis de Kaplan-Meier se analizó su capacidad para identificar a los pacientes en base a su supervivencia, y el gen *JMT1* resultó el candidato cuyo estado de metilación tenía mayor poder discriminatorio entre grupos de acuerdo a su supervivencia. Los pacientes cuya metilación en la región examinada superase el 30% presentan peor pronóstico que los pacientes con valores más bajos (**Figura 19**).

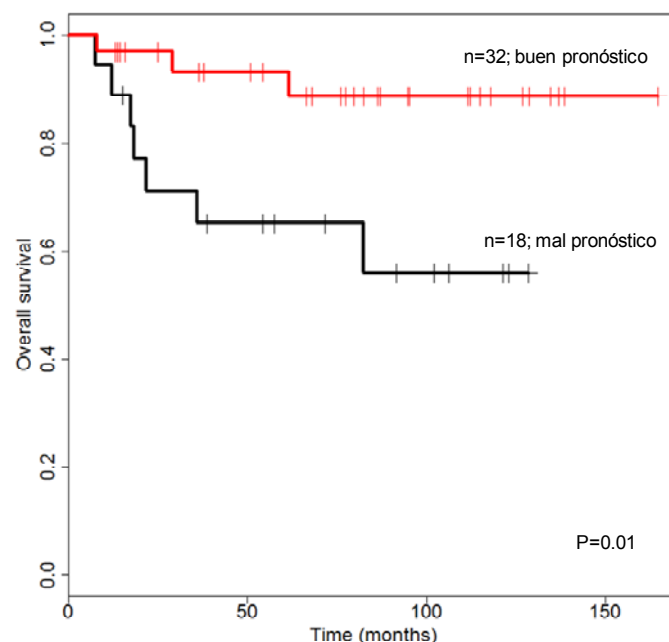


Figura 18: Análisis de Kaplan-Meier de supervivencia para el gen *JMT1*. Mediante un análisis de regresión-Cox multivariable con los datos obtenidos en la fase de validación, se ha definido un panel de marcadores pronóstico de supervivencia asociada a melanoma, independiente de otros factores como

profundidad Breslow, ulceración o índice mitótico. Entre ellos, el gen *JMT1* separa en dos grupos compensados a los pacientes de buen (rojo, n=32) y mal (negro, n=18) pronóstico.

DISCUSIÓN

El trabajo realizado a lo largo de esta tesis doctoral, ha tenido como objetivo global el de estudiar las alteraciones en la metilación del ADN a lo largo de la progresión tumoral. Mediante la aplicación de las técnicas más recientes de análisis epigenómico, se ha podido extender el panel de alteraciones descritas hasta la fecha. Ello, por un lado, ha demostrado la importancia de estudiar la regulación epigenética en cáncer de forma integral; y por otro, ha permitido conocer la repercusión que los cambios de metilación del ADN tienen en la regulación transcripcional de las células tumorales a lo largo de la progresión. A continuación, se discutirán los distintos aspectos abordados en este trabajo.

1. Aplicación de técnicas epigenómicas en el estudio del cáncer

En el estudio de la metilación del ADN en tejido normal y tumoral, se han venido aplicando diversas estrategias. Hasta hace poco, la mayor parte de estudios se dirigían a analizar genes cuya implicación en los mecanismos de patogénesis se conocía, y especialmente aquellos en que se había detectado cambios en expresión sin alteración genética asociada (Herman JG y Baylin SB, 2003). Mediante esta estrategia de "gen-candidato" se ha llegado a identificar un gran número de genes silenciados por hipermetilación aberrante de su promotor en cáncer (**Tablas 1-2**). Las primeras aproximaciones globales al estudio de las alteraciones de la metilación del ADN consistieron en métodos basados en el uso de enzimas de restricción. Técnicas como *Restriction Landmark Genomic Scanning* (RLGS), *Differential Methylation Hybridization* (DMH), o *Amplification of Intermethylated Sites* (AIMS) se basaban en el uso de enzimas de restricción con distinta actividad de corte para citosinas según su estado de metilación, y permitieron comparar los patrones de metilación globales de distintos tipos celulares o estadios de la enfermedad. Sin embargo, estas metodologías conllevaban laboriosos protocolos; sesgos procedentes de la distinta eficiencia de amplificación génica o la restricción completa de las secuencias diana; así como una limitación en las secuencias susceptibles de ser analizadas debido a la actividad de las enzimas de restricción. A pesar de todo, estas ingeniosas aproximaciones permitieron identificar nuevos genes alterados en cáncer, y conocer el alcance de las alteraciones epigenéticas en cáncer (Smiraglia DJ et al, 2001; Lewin J et al, 2007; Frigola J et al, 2005).

La combinación de análisis de expresión globales con el desenmascaramiento farmacológico de los genes reprimidos por hipermetilación aberrante usando el análogo de deoxicitidina 5-aza-2'-deoxicitidina (5-aza) o la tricostatina A (TSA), demostraron gran utilidad en la identificación de nuevas alteraciones epigenéticas en cáncer (**Figura 19**) (Lujambio A et al, 2008; Lind GE et al, 2006; Suzuki H et al, 2002; Yamashita K et al, 2002). Dos trabajos publicados en 2002 (Yamashita K et al, 2002; Suzuki H et al, 2002) aplicaron esta aproximación, en combinación con *arrays* de expresión antes y después de los tratamientos, al estudio de las alteraciones epigenéticas en cáncer de esófago y colon. Este ingenioso método abrió las puertas a la identificación de genes supresores tumorales alterados epigenéticamente, evitando las laboriosas etapas de localización, clonaje y caracterización de los genes de interés. No obstante, dos de los aspectos más importantes que reflejaron fueron, por un lado, la utilidad de los modelos celulares para identificar alteraciones clínicamente relevantes; y por otro, la profunda implicación de los procesos de inactivación epigenética en procesos neoplásicos, tal como se confirmó en estudios posteriores empleando esta estrategia (Lind GE et al, 2006; Yamashita K et al, 2002; Yamashita K et al, 2006; Lujambio A et al, 2008) (**Tablas 1-2**). El desenmascaramiento genético de genes silenciados por hipermetilación de su promotor expandió el catálogo de alteraciones epigenéticas en cáncer (**Figura 19**). Esto incluyó la disrupción de las dos principales DNMTs (DNMT1 y DNMT3B) en la línea celular de cáncer de colon Hct-116 (Rhee I et al, 2002), o la inhibición de las proteínas MBD de unión a ADN metilado (Lopez-Serra L et al, 2008), que producían una reversión de muchos procesos de silenciamiento epigenético y, en combinación con plataformas de expresión génica, permitieron identificar nuevas vías de señalización alteradas. La aplicación de estas estrategias basadas en el aprovechamiento de la plasticidad de la metilación del ADN, impulsaron la investigación epigenética en cáncer.

En los últimos años los avances tecnológicos han permitido desarrollar técnicas de análisis (epi-)genómico, sistemático y de gran resolución. El primer array de metilación apareció en 2005, permitiendo cuantificar la metilación en 1.505 CpGs en la región promotora de un panel de genes seleccionado por su implicación en cáncer, o en procesos relacionados (ciclo celular, apoptosis, adhesión celular, etc). Esta plataforma se empleó en el trabajo aquí presentado, en combinación con modelos *in vitro* de progresión metastásica, para identificar de forma directa los cambios de metilación en la diseminación de células cancerosas (Carmona FJ et al, 2012), y ha sido usada en otros estudios para analizar de forma global la dinámica de los cambios de metilación del ADN en cáncer (Fernandez AF et al, 2011). Frente a estrategias usadas

anteriormente, estas plataformas han permitido reducir los costes, simplificar el análisis, y cuantificar de forma directa y sistemática la metilación del ADN en distintos contextos experimentales. Posteriormente, versiones mejoradas de esta plataforma han incrementado la resolución sin aumentar por ello la dificultad de análisis, constituyendo una herramienta de fácil aplicación y gran reproducibilidad (Sandoval J et al, 2011). Concretamente, los datos del array de metilación obtenidos en este estudio han mostrado un significativo índice de correlación con la validación técnica por pirosecuenciación, demostrando la fiabilidad de los datos (**Figura s2** en Anexo 1). Asimismo, los estudios realizados con líneas celulares como modelos de progresión han demostrado un alto solapamiento con las alteraciones presentes en pacientes, confirmando su validez como herramientas para la investigación en cáncer y la traslación de los resultados a los pacientes.

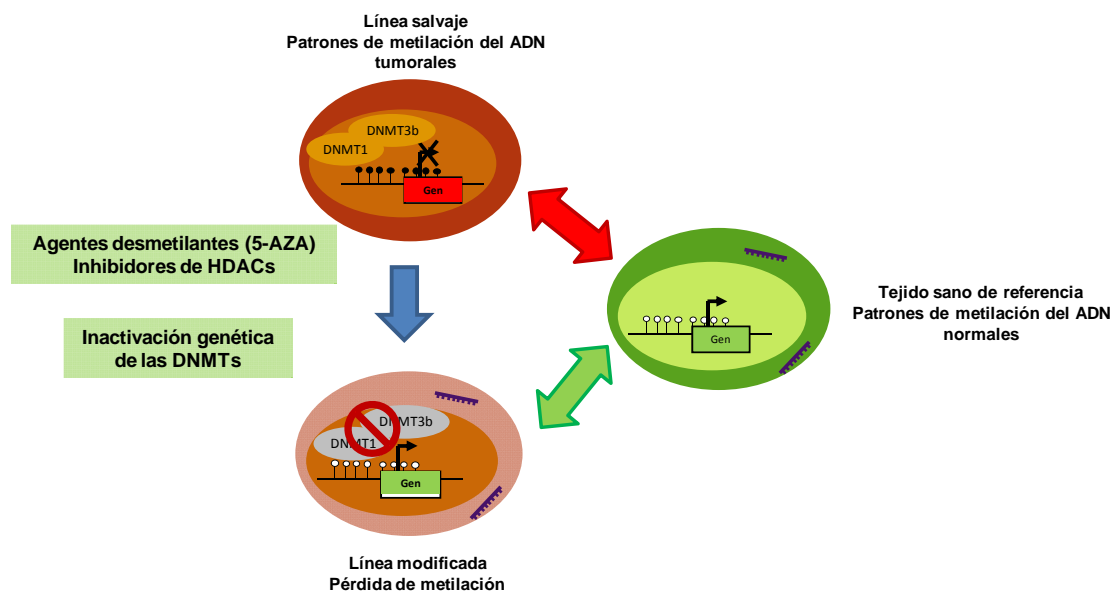


Figura 19: Estrategias de desenmascaramiento genético y farmacológico. Mediante el tratamiento con fármacos epigenéticos, o la inactivación de la maquinaria de metilación, se consigue eliminar gran parte de los patrones aberrantes de metilación del ADN en líneas celulares tumorales. Mediante la comparación de los patrones de expresión génica de la línea salvaje, la línea modificada, y teniendo como referencia los niveles de expresión en tejido sano, se identifican genes candidatos cuyos cambios de expresión puedan deberse a procesos de metilación aberrante. Aquellos genes cuya expresión se pierda entre tejido normal y la línea tumoral (flecha bidireccional roja), y se recuperen tras el tratamiento a niveles equiparables al tejido normal (flecha bidireccional verde) son candidatos a ser inactivados por hipermetilación de su región promotora.

Por último, se están comenzando a aplicar técnicas de secuenciación genómica masiva sobre ADN modificado por bisulfito. Esto está permitiendo cuantificar los niveles de metilación del ADN de todo el genoma, tanto humano como de otros organismos, en distintos modelos experimentales y contextos patológicos. Estudios

pioneros empleando esta aproximación han aportado importantes descubrimientos sobre la dinámica de metilación del ADN en que apuntan a nuevas funciones que las inicialmente descritas (Laurent L et al, 2010; Berman BP et al, 2011; Heyn H et al, 2012b), y permiten estudiar la dinámica de metilación del ADN fuera de los promotores e islas CpG. Conforme los costes asociados a la secuenciación genómica se reduzcan, y se optimicen y sistematicen los protocolos de análisis, esta estrategia se podrá aplicar de forma rutinaria tanto a nivel experimental, como en clínica para la evaluación de respuesta a terapia, recaída, pronóstico, etc, y permitirá aproximar de manera más certera el impacto de la regulación epigenética en cáncer.

2. Regulación epigenética del fenotipo metastásico

Hasta la fecha, los estudios que han investigado la contribución de las alteraciones epigenéticas al proceso de metástasis se han centrado en estudiar cambios de metilación en los promotores de genes candidatos en tipos tumorales concretos. Esta inactivación génica resulta en una ventaja adaptativa para la célula, que le permite escapar del foco tumoral primario e iniciar la cascada metastásica. El ejemplo más ilustrativo es el de la caderina-1 (*CDH1*). Las mutaciones germinales en el gen de la caderina-1 son causantes de las formas hereditarias de cáncer gástrico, mientras que las mutaciones somáticas se asocian a cáncer de mama. No obstante, el mecanismo predominante de inactivación de *CDH1* es epigenético mediante la hipermetilación del ADN de su promotor (Graff JR et al, 1995; Yoshiura K et al, 1995). De hecho, se ha comprobado que la inactivación epigenética es el mecanismo más conveniente de inactivación de genes supresores de metástasis para las células tumorales dada su naturaleza reversible. Se ha descrito la inactivación epigenética de *CDH1* en tumores primarios cuyas metástasis pareadas mostraban reexpresión transcripcional a causa de la desmetilación de su promotor, sugiriendo que la reversión del fenotipo mesenquimal es necesario para el establecimiento y desarrollo de focos tumorales metastásicos en el órgano diana (Graff JR et al, 2000; Chao YL et al, 2010).

En general, los genes supresores de metástasis inactivados por hipermetilación de su región promotora pertenecen a vías de adhesión celular (*CDH1*, *PCDH8*, *CD9*), genes implicados apoptosis y control de la proliferación (*NRDG1*, *EPHA7*, *NM23-H1*), inhibidores de proteinasas (*TIMP3*, *TFPI2*), trombospondinas (*THBS1*, *ADAMTS12*) y lamininas (*LAMA3*, *LAMA4*). No obstante, la hipermetilación de genes en relación a desarrollo metastásico no se ha abordado de forma comprensiva.

Uno de los objetivos de esta tesis doctoral pretendía acometer esta tarea mediante el uso de plataformas de *screening* de metilación en modelos celulares. Por tanto, mediante la comparación de líneas pareadas de tumor primario y metástasis procedentes de distintos tipos tumorales, perseguíamos identificar alteraciones inherentes al proceso de metástasis comunes a los tipos tumorales estudiados. En general las alteraciones identificadas en las líneas celulares tumorales son consistentes al trasladar los resultados a pacientes. Además, el empleo de líneas pareadas procedentes de distintas fases de progresión tumoral del mismo paciente constituyó una valiosa herramienta ya que se eliminó la variación inter-individual.

La intersección de los patrones de metilación de ambos tipos tumorales resultó en la selección de un único candidato: caderina-11 (OB-caderina). Esto resultó esperable debido, por un lado, a que los patrones de metilación están ampliamente determinados por los perfiles específicos de tejido a partir de los cuales se desarrolla un tumor (Esteller M et al, 2001; Fernandez AF et al, 2011), y a que la plataforma de metilación empleada restringe el análisis a 808 genes cuya función se haya relacionado con cáncer (Bibikova M et al, 2006). Con todo ello profundizamos en la caracterización de *CDH11* en el fenotipo metastásico.

La caderina-11 es una proteína integral de membrana que establece uniones homofílicas con células adyacentes a través de su dominio extracelular. Su implicación en metástasis se había estudiado previamente, aunque las funciones asignadas variaban según el tipo tumoral estudiado, sugiriendo que los componentes de la familia de las caderinas pueden contribuir de distinta forma al fenotipo en función del tipo celular (Van Marck V et al, 2011). Así, la expresión de *CDH11* en células tumorales de mama y próstata -ambos con un importante tropismo metastásico a hueso-, parece estimular la metástasis debido a la afinidad de unión por los osteoblastos que expresan niveles altos de esta proteína (Pishvaian MJ et al, 1999; Li Z et al, 2008; Huang CF et al 2010). Sin embargo, en otros tipos tumorales como retinoblastoma u osteosarcoma, se ha observado un efecto opuesto por el cual la pérdida de caderina-11 se asocia con fenotipos más invasivos, o su reexpresión reduce la incidencia de metástasis pulmonares (Marchong MN et al, 2010; Kashima T et al, 2003; Nakajima G et al, 2008). En nuestro modelo de estudio, el silenciamiento de *CDH11* correlaciona con el fenotipo metastásico, tal como hemos demostrado experimentalmente y han corroborado otros estudios (Gao L et al, 2013; Mueller DW et al, 2011), y resultados obtenidos en esta tesis mediante un abordaje experimental independiente.

Las conclusiones derivadas de estos resultados indican que CDH11 se comporta de manera similar a como lo hacen otros miembros de la misma familia, cuya inactivación contribuye a exacerbar el fenotipo tumoral. El ejemplo más conocido es el ya mencionado caso de la caderina-1 en la transición epitelio-mesénquima por la cual se sustituye su expresión por la de caderinas mesenquimales como las caderinas -N (*CDH2*) u -OB (*CDH11*). En este sentido conviene destacar que CDH11, a pesar de ser una caderina propia de células tumorales mesenquimales, su expresión no favorece la diseminación de las células tumorales, sino que contribuiría a su contención asegurando con su expresión la adhesión intercelular. Otro mecanismo supresor que estaría desempeñando la caderina-11, sería el de estabilizar la localización de beta-catenina en la membrana celular. Estudios previos han demostrado una interacción directa entre el dominio citoplasmático de CDH11 y beta-catenina (Kawaguchi J et al, 1999), por la cual se reducirían los efectos antiapoptóticos ejercidos por la vía Wnt/Be-ta-catenina (Marchong MN et al, 2010). Los resultados obtenidos sugieren por tanto que el silenciamiento epigenético de *CDH11* facilita la disgregación de las células tumorales mediante la disolución de las uniones intercelulares, y facilitando su diseminación por el torrente circulatorio.

Con el fin de evaluar el impacto clínico de la inactivación de la caderina-11, examinamos muestras de tumor primario y metástasis a nódulo linfático de pacientes afectados por los tipos tumorales aquí estudiados. Notablemente, encontramos que esta alteración estaba significativamente asociada al desarrollo de metástasis, pudiendo constituir un marcador indicativo de progresión tumoral en estos tipos tumorales de gran incidencia y mal pronóstico (**Figura 11**).

3. Patrones de metilación en la progresión del melanoma cutáneo

El melanoma cutáneo es, de entre los tipos tumorales de mayor incidencia según las estadísticas, la neoplasia menos estudiada desde el punto de vista epigenético. Numerosos procesos de inactivación epigenética se han identificado empleando estrategias gen-candidato, o plataformas de análisis epigenómico de baja resolución. A pesar de las contribuciones de estos estudios, hasta la fecha no se había realizado un estudio comprensivo de los cambios de metilación del ADN, comparando las distintas etapas de progresión en arrays de metilación de alta resolución y permitiendo establecer la cronología en que se dan dichas alteraciones.

En el estudio desarrollado se ha llevado a cabo (i) un análisis global de los patrones de metilación en muestras de pacientes representativas de todas las etapas de progresión tumoral; (ii) la correlación de los cambios de metilación observados con

perfiles de expresión génica, para conocer la relevancia funcional de las alteraciones identificadas; y (iii) se ha evaluado la solidez de los resultados obtenidos, mediante validación en cohortes clínicas independientes.

En primer lugar se investigaron los cambios de metilación asociados a la etapa de melanomagénesis, mediante la comparación de los perfiles exhibidos por los nevi benignos y los melanoma primarios. Tal como se ha comprobado en otros tipos tumorales, hay numerosos eventos de hipermetilación aberrante que produce la inactivación transcripcional de los genes afectados. De acuerdo con estudios previos, validamos la hipermetilación de genes del complejo mayor de histocompatibilidad (familia HLA) (Serrano A et al, 2001); *SOCS-1* y *-2*, implicados en la señalización de la vía JAK/STAT3; los componentes de la familia de receptores de necrosis tumoral *TNFRSF-10C* y *-10D* (Liu S et al, 2008); y componentes de la familia de genes *AP2*, que desempeñan importantes funciones en el desarrollo de la epidermis (Karjalainen JM et al, 1998). Los eventos de hipermetilación identificados en este punto ocurrían prevalentemente en zonas de alta densidad de CGs -islas CpG-, y asociados significativamente con regiones reguladoras de la transcripción.

Asimismo se identificaron procesos de pérdida de metilación del ADN, siendo más frecuentes en fases más avanzadas de progresión metastásica. Generalmente se ha observado que la hipometilación del ADN es uno de los eventos más tempranos que ocurren en transformación neoplásica. Esto se ha correlacionado con la reactivación de secuencias transponibles y con un incremento en la tasa de mutaciones génicas. No obstante, estos resultados provienen de la cuantificación de los niveles globales de metilación del ADN por técnicas como HPLC, o del análisis de secuencias concretas. A partir de los datos obtenidos en el presente estudio, comprobamos que el número de genes que experimentaban pérdida de metilación era superior en fases avanzadas de la progresión (**Figura 14**).

Con el fin de desentrañar el impacto de los cambios de metilación observados en los perfiles de expresión génica, correlacionamos los datos de metilación de ADN con bases de datos de expresión génica sobre el mismo tipo de muestras que fueron publicados previamente (Riker et al 2008; Xu et al 2008; Scatolini et al 2010). Para el 21,7% de los cambios de metilación de ADN identificados se encontró una correlación negativa con cambios de expresión en alguna de las bases de datos analizadas. Hay que tener en cuenta que esta aproximación puede ser restrictiva dado que no se está valorando la expresión y la metilación en las mismas muestras, y es posible por tanto que subestime la relevancia de los procesos epigenéticos en la progresión del

melanoma. Combinando los resultados con un análisis de ontología génica, pudimos explorar las vías de señalización y procesos afectados por metilación aberrante del ADN. Así, comprobamos que la hipermetilación de los promotores génicos en muestras tumorales (primarios y metástasis), en comparación con los tejidos control, afectaban de manera predominante a genes implicados en procesos de adhesión celular y diferenciación terminal. La adhesión celular es una característica común de las células neoplásicas que favorece la diseminación de las células, y en particular la caderina-11 (CDH11) se encuentra entre los genes más frecuentemente hipermetilados en las muestras de melanoma analizadas. La inactivación epigenética de este gen se identificó en la progresión metastásica de melanoma y cáncer de cabeza y cuello en resultados incluidos en la presente tesis (Carmona FJ et al, 2012), y ha sido confirmado en un estudio reciente elaborado por un grupo independiente estudiando la metilación aberrante en melanoma (Gao L et al, 2013). Se ha postulado que la inactivación epigenética en cáncer afecta en gran medida a genes implicados en desarrollo y pro-diferenciación por hipermetilación de su promotor (Ohm JE et al, 2007; Widschwendter M et al, 2007). En melanoma, la inactivación permanente de estos genes podría estar reflejando una pérdida de marcas de diferenciación terminal, lo que induciría que las células tumorales adquiriesen una mayor plasticidad que favorezca la progresión tumoral.

La activación transcripcional aberrante causada por hipometilación de regiones promotoras, converge en genes implicados en procesos inmunes e inflamatorios. Se a hipotetizado que la expresión de estos factores en estadíos avanzados podría interferir con los procesos de inmunidad innata anti-tumoral favoreciendo así la progresión neoplásica (Mori T et al, 2005; Goto Y et al, 2008).

Notablemente, analizando los perfiles de metilación en los melanomas primarios se identificaron dos grupos con perfiles de metilación diferentes. Los tumores de uno de los grupos (n=8) incluía los estadíos más avanzados y con mayor profundidad Breslow. En éstos identificamos una serie de genes diferencialmente metilados entre los melanomas en estadíos iniciales y aquellos más avanzados, cuyo perfil exhibido coincidía en gran medida con el mostrado en las lesiones metastásicas, indicando procesos de inactivación epigenética asociados con fases más avanzadas de progresión. De forma recurrente aparecen genes con dominios *homeo-box* asociados a regulación transcripcional en procesos de diferenciación terminal como *PAX6* (paired-box 6), *HOXA9* (homeobox A9), o *EVX2* (even-skipped homeobox 2). Las alteraciones en la expresión de estos genes podrían desempeñar un papel en el fenotipo de las células tumorales, y merecen una caracterización más detallada. Esto

encaja con observaciones previas hechas a partir de estudios de transcriptómica, según los cuales, los cambios de expresión más significativos ocurren en los melanomas primarios y se asocian con la transición de fase de crecimiento radial a vertical, y con diseminación metastásica (Hoek K et al, 2007). En esta línea conviene destacar que las muestras que hemos analizado en el array son todo casos en fase de crecimiento vertical. No obstante, el cambio de metilación que observamos en los casos más avanzados podrían estar reflejando una estabilización del fenotipo invasivo mediante la hipermetilación del ADN, en comparación con casos menos avanzados pero en fase vertical igualmente que no muestran estos cambios.

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran la relevancia de los cambios de metilación del ADN en la progresión del melanoma. En etapas iniciales, los procesos de inactivación epigenética inducen una pérdida de adhesión celular y truncan los programas de diferenciación terminal, permitiendo con ello la diseminación celular y dotándoles de una mayor plasticidad que favorece el fenotipo metastásico. En estadios más avanzados, hay cambios de metilación que reflejan la regulación epigenética en la transformación fenotípica que han descrito estudios previos (Hoek KS 2007; Smith et al., 2005; Jensen EH et al., 2006). Conforme las células de melanoma profundizan en la dermis adquieren los patrones de metilación -y con ello de expresión- que se observan posteriormente en las lesiones metastásicas. Llegado este punto, la hipometilación del ADN podría cobrar importancia induciendo la activación aberrante de procesos inflamatorios e inmunes que se han asociado con progresión metastásica (Mantovani A et al, 2011; Spicer JD et al, 2012) y mal pronóstico (Kim S et al, 2008).

4. Biomarcadores de metilación del ADN en melanoma cutáneo

La investigación en biomarcadores capaces de predecir el comportamiento de las células tumorales, es esencial para estratificar de forma eficiente a los pacientes afectados y aumentar la eficacia de las terapias anti-tumorales. Los marcadores aplicados a día de hoy en la clínica para la clasificación de este tipo tumoral se basan en parámetros histológicos -profundidad Breslow, grado de ulceración e índice mitótico, principalmente. El único marcador molecular empleado es el nivel de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), cuyos niveles elevados se asocian con presencia de metástasis, aunque es frecuente encontrar pacientes con metástasis y niveles normales de LDH.

La búsqueda de biomarcadores moleculares que puedan complementar la evaluación histológica y tengan valor diagnóstico y pronóstico se han llevado a cabo

principalmente mediante análisis globales de expresión génica. No obstante, estos estudios han examinado líneas celulares, muestras metastásicas o primarias, pero en ningún caso se ha evaluado toda la escala de progresión (Winnepenninckx V et al, 2006; Berger MF et al, 2010). Por otro lado, los estudios enfocados en el estudio de los cambios de metilación del ADN en melanoma se han llevado a cabo usando plataformas de reducida resolución (Conway K et al, 2011; Gao L et al, 2013), o con un importante sesgo técnico inherente a la metodología empleada (Koga Y et al, 2009).

Los resultados obtenidos en este estudio han permitido establecer una panorámica de la dinámica de la metilación del ADN a lo largo de la progresión del melanoma. Así como la hipermetilación de *MGMT* y *GSTP1* han demostrado gran utilidad en la predicción de respuesta a quimioterapia (Esteller M et al, 2000; Bleeker et al, 2012) y la detección de cáncer de próstata (Jeronimo et al, 2001), respectivamente, los marcadores reconocidos en este trabajo tienen un potencial equivalente. Actualmente no existe ningún marcador molecular con valor pronóstico en melanoma. Pese a haberse identificado en una cohorte de pequeño tamaño la identificación del gene *JMT1* como predictor de supervivencia puede tener importantes implicaciones clínicas para el tratamiento del melanoma. Esto resulta de especial relevancia para los pacientes en estadios I y II en que se podría aplicar un regimen de terapia más adecuado y hacer un seguimiento más estrecho en aquellos pacientes con peor pronóstico. Además, los biomarcadores de metilación se posicionan mejor frente a biomarcadores basados en firmas de expresión o parámetros histológicos, debido a su estabilidad, a la categorización de sus valores, y a la disponibilidad de técnicas para medirlos. El análisis de los marcadores identificados en la presente tesis en grandes cohortes de pacientes por grupos de investigación independientes, deberá ser acometido para confirmar su potencial interés en el diagnóstico del melanoma, seguimiento de la progresión, y en la predicción de supervivencia de los pacientes.

CONCLUSIONES

A tenor de los resultados obtenidos, se derivan las siguientes conclusiones:

- El empleo de arrays en el estudio de los cambios de metilación del ADN constituye una aproximación fiable, asequible y altamente reproducible, aplicable a diversos contextos experimentales.
- Los modelos celulares *in vitro*, representan un modelo válido para el estudio de las alteraciones moleculares en procesos neoplásicos, ya que recapitulan en gran medida los mecanismos de carcinogénesis presentes en los pacientes.
- La progresión metastática de las células tumorales está determinada, en cierta medida, por los cambios epigenéticos que ocurren en las fases más avanzadas de un tumor primario, e incrementan la capacidad de diseminación celular.
- Las moléculas de adhesión y los programas de diferenciación terminal, son una diana frecuente de eventos de inactivación epigenética en cáncer en relación a progresión tumoral.
- La hipometilación del ADN en fases avanzadas de la progresión del melanoma estimula la activación aberrante de procesos inmunes e inflamatorios que mantienen y fomentan el fenotipo tumoral.
- La dinámica en la metilación del ADN a lo largo de la progresión del melanoma, tiene gran relevancia en el fenotipo tumoral, explicando gran parte de las observaciones realizadas en estudios de transcriptómica.
- Los biomarcadores de metilación identificados tienen potencial relevancia clínica para el diagnóstico, evaluación de progresión y pronóstico del melanoma cutáneo.

BIBLIOGRAFÍA

Aapola U, Liiv I, Peterson P. Imprinting regulator DNMT3L is a transcriptional repressor associated with histone deacetylase activity. *Nucleic Acids Res.* 2002 Aug 15;30(16):3602-8.

Adorjan P, Distler J, Lipscher E, et al. Tumour class prediction and discovery by microarray-based DNA methylation analysis. *Nucleic acids research* 2002;30(5):e21.

Xu L, Shen SS, Hoshida Y, Subramanian A, Ross K, Brunet JP, Wagner SN, Ramaswamy S, Mesirov JP, Hynes RO. Gene expression changes in an animal melanoma model correlate with aggressiveness of human melanoma metastases. *Mol Cancer Res.* 2008 May;6(5):760-9

Agirre X, Vilas-Zornoza A, Jiménez-Velasco A, Martín-Subero JI, Cordeu L, Gárate L, San José-Eneriz E, Abizanda G, Rodríguez-Otero P, Fortes P, Rifón J, Bandrés E, Calasanz MJ, Martín V, Heiniger A, Torres A, Siebert R, Román-Gomez J, Prósper F. Epigenetic silencing of the tumor suppressor microRNA Hsa-miR-124a regulates CDK6 expression and confers a poor prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res.* 2009 May 15;69(10):4443-53.

Allfrey VG, LITTAU VC, MIRSKY AE. On the role of histones in regulation of ribonucleic acid synthesis in the cell nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1963

Ball MP, Li JB, Gao Y, Lee JH, LeProust EM, Park IH, Xie B, Daley GQ, Church GM. Targeted and genome-scale strategies reveal gene-body methylation signatures in human cells.

Ballestar E, Paz MF, Valle L, Wei S, Fraga MF, Espada J, Cigudosa JC, Huang TH, Esteller M. Methyl-CpG binding proteins identify novel sites of epigenetic inactivation in human cancer. *EMBO J.* 2003 Dec 1;22(23):6335-45.

Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* 2011 Mar;21(3):381-95.

Barretina J, Caponigro G, Stransky N, Venkatesan K, Margolin AA, Kim S, Wilson CJ, Lehár J, Kryukov GV, Sonkin D, Reddy A, Liu M, Murray L, Berger MF, Monahan JE, Morais P, Meltzer J, Korejwa A, Jané-Valbuena J, Mapa FA, Thibault J, Bric-Furlong E, Raman P, Shipway A, Engels IH, Cheng J, Yu GK, Yu J, Aspesi P Jr, de Silva M, Jagtap K, Jones MD, Wang L, Hatton C, Palesscandolo E, Gupta S, Mahan S, Sougnez

C, Onofrio RC, Liefeld T, MacConaill L, Winckler W, Reich M, Li N, Mesirov JP, Gabriel SB, Getz G, Ardlie K, Chan V, Myer VE, Weber BL, Porter J, Warmuth M, Finan P, Harris JL, Meyerson M, Golub TR, Morrissey MP, Sellers WR, Schlegel R, Garraway LA. The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature*. 2012 Mar 28;483(7391):603-7.

Bartel DP, Chen CZ. Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs. *Nat Rev Genet*. 2004 May;5(5):396-400.

Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009 Jan 23;136(2):215-33

Beaulieu N, Morin S, Chute IC, Robert MF, Nguyen H, MacLeod AR. An essential role for DNA methyltransferase DNMT3B in cancer cell survival. *J Biol Chem*. 2002 Aug 2;277(31):28176-81.

Bell O, Tiwari VK, Thomä NH, Schübeler D. Determinants and dynamics of genome accessibility. *Nat Rev Genet*. 2011 Jul 12;12(8):554-64.

Berger MF, Levin JZ, Vijayendran K, Sivachenko A, Adiconis X, Maguire J, Johnson LA, Robinson J, Verhaak RG, Sougnez C, Onofrio RC, Ziaugra L, Cibulskis K, Laine E, Barretina J, Winckler W, Fisher DE, Getz G, Meyerson M, Jaffe DB, Gabriel SB, Lander ES, Dummer R, Gnirke A, Nusbaum C, Garraway LA. Integrative analysis of the melanoma transcriptome. *Genome Res*. 2010 Apr;20(4):413-27.

Berger SL, Kouzarides T, Shiekhatair R, Shilatifard A. An operational definition of epigenetics. *Genes Dev*. 2009 Apr 1;23(7):781-3.

Berman BP, Weisenberger DJ, Aman JF, Hinoue T, Ramjan Z, Liu Y, Noushmehr H, Lange CP, van Dijk CM, Tollenaar RA, Van Den Berg D, Laird PW. Regions of focal DNA hypermethylation and long-range hypomethylation in colorectal cancer coincide with nuclear lamina-associated domains. *Nat Genet*. 2011 Nov 27;44(1):40-6

Bibikova M, Lin Z, Zhou L, Chudin E, Garcia EW, Wu B, Doucet D, Thomas NJ, Wang Y, Vollmer E, Goldmann T, Seifart C, Jiang W, Barker DL, Chee MS, Floros J, Fan JB. High-throughput DNA methylation profiling using universal bead arrays. *Genome Res*. 2006 Mar;16(3):383-93.

Bird AP, Taggart MH, Smith BA. Methylated and unmethylated ADN compartments in the sea urchin genome. *Cell* 1979, 17:889-901

Breslow A. Tumor thickness in evaluating prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg.* 1978 Apr;187(4):440.

Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer.* 2006 Nov;6(11):857-66

Carey M, Li B, Workman JL. RSC exploits histone acetylation to abrogate the nucleosomal block to RNA polymerase II elongation. *Mol Cell.* 2006 Nov 3;24(3):481-7.

Carmona FJ and Esteller M. Epigenomics of human colon Cancer. *Mutat Res.* 2010 Nov 10;693(1-2):53-60

Carmona FJ and Esteller M. IDIBELL cancer conference on metastasis and angiogenesis. *Cancer Res.* 2011 Oct 1;71(19):6097-101

Carmona FJ*, Azuara D*, Berenguer-Llargo A*, Gernandez AF, Biondo S, de Oca J, Rodriguez-Moranta F, Salazar R, Villanueva A, Fraga MF, Guardiola J, Capellá G, Esteller M, Moreno V. DNA methylation biomarkers for non-invasive diagnostic of Colorectal Cancer. *Can Prev Res* 2013 (in press)

Carmona FJ, Esteller M. Epigenomics of human colon cancer. *Mutat Res.* 2010 Nov 10;693(1-2):53-60

Carmona FJ, Villanueva A, Vidal A, Muñoz C, Puertas S, Penin RM, Gomà M, Lujambio A, Piulats JM, Mesía R, Sánchez-Céspedes M, Manós M, Condom E, Eccles SA, Esteller M. Epigenetic disruption of cadherin-11 in human cancer metastasis. *J Pathol.* 2012 Oct;228(2):230-40.

Cedar H, Bergman Y. Programming of DNA methylation patterns. *Annu Rev Biochem.* 2012;81:97-117.

Chao YL, Shepard CR, Wells A. Breast carcinoma cells re-express E-cadherin during mesenchymal to epithelial reverting transition. *Mol Cancer.* 2010 Jul 7;9:179. doi: 10.1186/1476-4598-9-179.

Chitnis NS, Pytel D, Bobrovnikova-Marjon E, Pant D, Zheng H, Maas NL, Frederick B, Kushner JA, Chodosh LA, Koumenis C, Fuchs SY, Diehl JA. miR-211 is a prosurvival microRNA that regulates chop expression in a PERK-dependent manner. *Mol Cell.* 2012 Nov 9;48(3):353-64.

Clapier CR, Cairns BR. The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu Rev Biochem.* 2009;78:273-304.

Clark SJ, Harrison J, Paul CL, Frommer M. High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic acids research* 1994;22(15):2990-7

Claus R, Lucas DM, Stilgenbauer S, Ruppert AS, Yu L, Zucknick M, Mertens D, Bühler A, Oakes CC, Larson RA, Kay NE, Jelinek DF, Kipps TJ, Rassenti LZ, Gribben JG, Döhner H, Heerema NA, Marcucci G, Plass C, Byrd JC. Quantitative DNA methylation analysis identifies a single CpG dinucleotide important for ZAP-70 expression and predictive of prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2012 Jul 10;30(20):2483-91.

Conway K, Edmiston SN, Khondker ZS, Groben PA, Zhou X, Chu H, Kuan PF, Hao H, Carson C, Berwick M, Olilla DW, Thomas NE. DNA-methylation profiling distinguishes malignant melanomas from benign nevi. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2011 Apr;24(2):352-60.

Costa Y, Ding J, Theunissen TW, Faiola F, Hore TA, Shliha PV, Fidalgo M, Saunders A, Lawrence M, Dietmann S, Das S, Levasseur DN, Li Z, Xu M, Reik W, Silva JC, Wang J. NANOG-dependent function of TET1 and TET2 in establishment of pluripotency. *Nature*. 2013 Mar 21;495(7441):370-4

Costanzi C, Stein P, Worrada DM, Schultz RM, Pehrson JR. Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female preimplantation mouse embryos. *Development*. 2000 Jun;127(11):2283-9.

Costello JF, Frühwald MC, Smiraglia DJ, Rush LJ, Robertson GP, Gao X, Wright FA, Feramisco JD, Peltomäki P, Lang JC, Schuller DE, Yu L, Bloomfield CD, Caligiuri MA, Yates A, Nishikawa R, Su Huang H, Petrelli NJ, Zhang X, O'Dorisio MS, Held WA, Cavenee WK, Plass C. Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nat Genet*. 2000 Feb;24(2):132-8.

Cronin M, Sangli C, Liu ML, Pho M, Dutta D, Nguyen A, Jeong J, Wu J, Langone KC, Watson D. Analytical validation of the Oncotype DX genomic diagnostic test for recurrence prognosis and therapeutic response prediction in node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *Clin Chem*. 2007 Jun;53(6):1084-91.

Crouse HV, Brown A, Mumford BC. Chromosome inheritance and the problem of chromosome "imprinting" in *Sciara* (Sciaridae, Diptera). *Chromosoma*. 1971; 34(3):324-39.

Crouse, H. V. Translocations in *Sciara*: their bearing on chromosome behavior and sex determination. *Univ. Missouri Res. Bull*. 1943; 379: 1–75

Cui H, Cruz-Correa M, Giardiello FM, Hutcheon DF, Kafonek DR, Brandenburg S, Wu Y, He X, Powe NR, Feinberg AP. Loss of IGF2 imprinting: a potential marker of colorectal cancer risk. *Science*. 2003 Mar 14;299(5613):1753-5.

Deplus R, Brenner C, Burgers WA, Putmans P, Kouzarides T, de Launoit Y, Fuks F. Dnmt3L is a transcriptional repressor that recruits histone deacetylase. *Nucleic Acids Res*. 2002 Sep 1;30(17):3831-8.

Derks S, Bosch LJ, Niessen HE, Moerkerk PT, van den Bosch SM, Carvalho B, Mongera S, Voncken JW, Meijer GA, de Bruïne AP, Herman JG, van Engeland M. Promoter CpG island hypermethylation- and H3K9me3 and H3K27me3-mediated epigenetic silencing targets the deleted in colon cancer (DCC) gene in colorectal carcinogenesis without affecting neighboring genes on chromosomal region 18q21. *Carcinogenesis*. 2009 Jun;30(6):1041-8. doi: 10.1093/carcin/bgp073. Epub 2009 Mar 27.

deVos T, Tetzner R, Model F, Weiss G, Schuster M, Distler J, Steiger KV, Grützmann R, Pilarsky C, Habermann JK, Fleshner PR, Oubre BM, Day R, Sledziewski AZ, Lofton-Day C. Circulating methylated SEPT9 DNA in plasma is a biomarker for colorectal cancer. *Clin Chem*. 2009 Jul;55(7):1337-46. *Clin Chem*. 2009 Jul;55(7):1337-46.

Dews M, Homayouni A, Yu D, Murphy D, Seignani C, Wentzel E, Furth EE, Lee WM, Enders GH, Mendell JT, Thomas-Tikhonenko A. Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster. *Nat Genet*. 2006 Sep;38(9):1060-5

Dierlamm J, Michaux L, Criel A, Wlodarska I, Van den Berghe H, Hossfeld DK. Genetic abnormalities in chronic lymphocytic leukemia and their clinical and prognostic implications. *Cancer Genet Cytogenet*. 1997 Mar;94(1):27-35

Down TA, Rakyan VK, Turner DJ, et al. A Bayesian deconvolution strategy for immunoprecipitation-based DNA methylome analysis. *Nature biotechnology* 2008;26(7):779-85

Eccles SA, Welch DR. Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies. *Lancet*. 2007 May 19;369(9574):1742-57.

Elango N, Yi SV. DNA methylation and structural and functional bimodality of vertebrate promoters. *Mol Biol Evol*. 2008 Aug;25(8):1602-8

Elsheikh SE, Green AR, Rakha EA, Powe DG, Ahmed RA, Collins HM, Soria D, Garibaldi JM, Paish CE, Ammar AA, Grainge MJ, Ball GR, Abdelghany MK, Martinez-

Pomares L, Heery DM, Ellis IO. Global histone modifications in breast cancer correlate with tumor phenotypes, prognostic factors, and patient outcome. *Cancer Res.* 2009 May 1;69(9):3802-9.

Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006 Apr;6(4):259-69.

Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res.* 2001 Apr 15;61(8):3225-9

Esteller M, Corn PG, Urena JM, Gabrielson E, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of glutathione S-transferase P1 gene by promoter hypermethylation in human neoplasia. *Cancer Res.* 1998 Oct 15;58(20):4515-8

Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med.* 2000 Nov 9;343(19):1350-4.

Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nature reviews* 2007;8(4):286-98

Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med.* 2008 Mar 13;358(11):1148-59.

Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet.* 2011 Nov 18;12(12):861-74.

Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature.* 1983 Jan 6;301(5895):89-92.

Feng S, Cokus SJ, Zhang X, Chen PY, Bostick M, Goll MG, Hetzel J, Jain J, Strauss SH, Halpern ME, Ukomadu C, Sadler KC, Pradhan S, Pellegrini M, Jacobsen SE. Conservation and divergence of methylation patterning in plants and animals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 May 11;107(19):8689-94.

Fernandez AF, Assenov Y, Martin-Subero JI, Balint B, Siebert R, Taniguchi H, Yamamoto H, Hidalgo M, Tan AC, Galm O, Ferrer I, Sanchez-Cespedes M, Villanueva A, Carmona J, Sanchez-Mut JV, Berdasco M, Moreno V, Capella G, Monk D, Ballestar E, Ropero S, Martinez R, Sanchez-Carbayo M, Prosper F, Agirre X, Fraga MF, Graña O, Perez-Jurado L, Mora J, Puig S, Prat J, Badimon L, Puca AA, Meltzer SJ, Lengauer T, Bridgewater J, Bock C, Esteller M. A DNA methylation fingerprint of 1628 human samples. *Genome Res.* 2012 Feb;22(2):407-19.

Ferreira H, Flaus A, Owen-Hughes T. Histone modification influence the action of Snf2 family remodelling enzymes by different mechanisms. *J Mol Biol*, 374:563-79

Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*. 2003 Jun;3(6):453-8.

Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G, Bonaldi T, Haydon C, Ropero S, Petrie K, Iyer NG, Pérez-Rosado A, Calvo E, Lopez JA, Cano A, Calasanz MJ, Colomer D, Piris MA, Ahn N, Imhof A, Caldas C, Jenuwein T, Esteller M. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet*. 2005 Apr;37(4):391-400

Frigola J, Solé X, Paz MF, Moreno V, Esteller M, Capellà G, Peinado MA. Differential DNA hypermethylation and hypomethylation signatures in colorectal cancer. *Hum Mol Genet*. 2005 Jan 15;14(2):319-26.

Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL, Paul CL. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Mar 1;89(5):1827-31.

Frommer M, McDonald LE, Millar DS, et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992;89(5):1827-31.

Gallardo E, Navarro A, Viñolas N, Marrades RM, Diaz T, Gel B, Quera A, Bandres E, Garcia-Foncillas J, Ramirez J, Monzo M. miR-34a as a prognostic marker of relapse in surgically resected non-small-cell lung cancer. *Carcinogenesis*. 2009 Nov;30(11):1903-9.

Gao L, Smit MA, van den Oord JJ, Goeman JJ, Verdegaal EM, van der Burg SH, Stas M, Beck S, Gruis NA, Tensen CP, Willemze R, Peeper DS, van Doorn R. Genome-wide promoter methylation analysis identifies epigenetic silencing of MAPK13 in primary cutaneous melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2013 Mar 21. doi: 10.1111/pcmr.12096.

Garinis GA, Patrinos GP, Spanakis NE, Menounos PG. DNA hypermethylation: when tumour suppressor genes go silent. *Hum Genet*. 2002 Aug;111(2):115-27

Glas AM, Floore A, Delahaye LJ, Witteveen AT, Pover RC, Bakx N, Lahti-Domenici JS, Bruinsma TJ, Warmoes MO, Bernards R, Wessels LF, Van't Veer LJ. Converting a breast cancer microarray signature into a high-throughput diagnostic test. *BMC Genomics*. 2006 Oct 30;7:278.

Globisch D, Münzel M, Müller M, Michalakis S, Wagner M, Koch S, Brückl T, Biel M, Carell T. Tissue distribution of 5-hydroxymethylcytosine and search for active demethylation intermediates. *PLoS One*. 2010 Dec 23;5(12):e15367

Goto Y, Arigami T, Kitago M, Nguyen SL, Narita N, Ferrone S, Morton DL, Irie RF, Hoon DS. Activation of Toll-like receptors 2, 3, and 4 on human melanoma cells induces inflammatory factors. *Mol Cancer Ther*. 2008 Nov;7(11):3642-53

Graff JR, Gabrielson E, Fujii H, Baylin SB, Herman JG. Methylation patterns of the E-cadherin 5' CpG island are unstable and reflect the dynamic, heterogeneous loss of E-cadherin expression during metastatic progression. *J Biol Chem*. 2000 Jan 28;275(4):2727-32.

Graff JR, Herman JG, Lapidus RG, Chopra H, Xu R, Jarrard DF, Isaacs WB, Pitha PM, Davidson NE, Baylin SB. E-cadherin expression is silenced by DNA hypermethylation in human breast and prostate carcinomas. *Cancer Res*. 1995 Nov 15;55(22):5195-9.

Growher H, Leismann O, Jeltsch A: ADN of *Drosophila melanogaster* contains 5-methylcytosine. *EMBO J* 2000, 19:6918-6923

Guenther MG, Levine SS, Boyer LA, Jaenisch R, Young RA. A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells. *Cell*. 2007 Jul 13;130(1):77-88.

Guo JU, Su Y, Zhong C, Ming GL, Song H. Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain. *Cell*. 2011 Apr 29;145(3):423-34

Gupta A, Guerin-Peyrou TG, Sharma GG, Park C, Agarwal M, Ganju RK, Pandita S, Choi K, Sukumar S, Pandita RK, Ludwig T, Pandita TK. The mammalian ortholog of *Drosophila* MOF that acetylates histone H4 lysine 16 is essential for embryogenesis and oncogenesis. *Mol Cell Biol*. 2008 Jan;28(1):397-409. Epub 2007 Oct 29.

Gupta RA, Shah N, Wang KC, Kim J, Horlings HM, Wong DJ, Tsai MC, Hung T, Argani P, Rinn JL, Wang Y, Brzoska P, Kong B, Li R, West RB, van de Vijver MJ, Sukumar S, Chang HY. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature*. 2010 Apr 15;464(7291):1071-6.

Hahn MA, Wu X, Li AX, Hahn T, Pfeifer GP. Relationship between gene body DNA methylation and intragenic H3K9me3 and H3K36me3 chromatin marks. *PLoS One*. 2011 Apr 19;6(4):e18844

Hajji N, Wallenborg K, Vlachos P, Füllgrabe J, Hermanson O, Joseph B. Opposing effects of hMOF and SIRT1 on H4K16 acetylation and the sensitivity to the topoisomerase II inhibitor etoposide. *Oncogene*. 2010 Apr 15;29(15):2192-204.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57-70.

Harbeck N, Salem M, Nitz U, Gluz O, Liedtke C. Personalized treatment of early-stage breast cancer: present concepts and future directions. *Cancer Treat Rev*. 2010 Dec;36(8):584-94

He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*. 2004 Jul;5(7):522-31.

Heintzman ND, Stuart RK, Hon G, Fu Y, Ching CW, Hawkins RD, Barrera LO, Van Calcar S, Qu C, Ching KA, Wang W, Weng Z, Green RD, Crawford GE, Ren B. Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nat Genet*. 2007 Mar;39(3):311-8.

Hellman A, Chess A. Gene body-specific methylation on the active X chromosome. *Science*. 2007 Feb 23;315(5815):1141-3.

Heo I, Joo C, Cho J, Ha M, Han J, Kim VN. Lin28 mediates the terminal uridylation of let-7 precursor MicroRNA. *Mol Cell*. 2008 Oct 24;32(2):276-84. doi: 10.1016/j.molcel.2008.09.014.

Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med*. 2003 Nov 20;349(21):2042-547

Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Natl Acad Sci U S A*. 1996 Sep 3;93(18):9821-6

Heyn H, Li N, Ferreira HJ, Moran S, Pisano DG, Gomez A, Diez J, Sanchez-Mut JV, Setien F, Carmona FJ, Puca AA, Sayols S, Pujana MA, Serra-Musach J, Iglesias-Platas I, Formiga F, Fernandez AF, Fraga MF, Heath SC, Valencia A, Gut IG, Wang J, Esteller M. Distinct DNA methylomes of newborns and centenarians. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Jun 26;109(26):10522-7.

Heyn H, Vidal E, Sayols S, Sanchez-Mut JV, Moran S, Medina I, Sandoval J, Simó-Riudalbas L, Szczesna K, Huertas D, Gatto S, Matarazzo MR, Dopazo J, Esteller M. Whole-genome bisulfite DNA sequencing of a DNMT3B mutant patient. *Epigenetics*. 2012 Jun 1;7(6):542-50.

Hoek KS. DNA microarray analyses of melanoma gene expression: a decade in the mines. *Pigment Cell Res*. 2007 Dec;20(6):466-84

Holliday R, Pugh JE. DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science*. 1975 Jan 24;187(4173):226-32.

Holliday R. Epigenetics: a historical overview. *Epigenetics*. 2006 Apr-Jun;1(2):76-80.

Hon G, Ren B, Wang W. ChromaSig: a probabilistic approach to finding common chromatin signatures in the human genome. *PLoS Comput Biol*. 2008 Oct;4(10):e1000201

Hon GC, Hawkins RD, Caballero OL, Lo C, Lister R, Pelizzola M, Valsesia A, Ye Z, Kuan S, Edsall LE, Camargo AA, Stevenson BJ, Ecker JR, Bafna V, Strausberg RL, Simpson AJ, Ren B. Global DNA hypomethylation coupled to repressive chromatin domain formation and gene silencing in breast cancer. *Genome Res*. 2012 Feb;22(2):246-58.

Huang CF, Lira C, Chu K, Bilen MA, Lee YC, Ye X, Kim SM, Ortiz A, Wu FL, Logothetis CJ, Yu-Lee LY, Lin SH. Cadherin-11 increases migration and invasion of prostate cancer cells and enhances their interaction with osteoblasts. *Cancer Res*. 2010 Jun 1;70(11):4580-9.

Huffman DM, Grizzle WE, Bamman MM, Kim JS, Eltoum IA, Elgavish A, Nagy TR. SIRT1 is significantly elevated in mouse and human prostate cancer. *Cancer Res*. 2007 Jul 15;67(14):6612-8.

Issa JP, Kantarjian HM. Targeting DNA methylation. *Clin Cancer Res*. 2009 Jun 15;15(12):3938-46.

Jacinto FV, Ballestar E, Roper S, Esteller M. Discovery of epigenetically silenced genes by methylated DNA immunoprecipitation in colon cancer cells. *Cancer research* 2007;67(24):11481-6.

Jazdzewski K, Murray EL, Franssila K, Jarzab B, Schoenberg DR, de la Chapelle A. Common SNP in pre-miR-146a decreases mature miR expression and predisposes to papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 May 20;105(20):7269-74.

Jensen EH, Lewis JM, McLoughlin JM, Alvarado MD, Daud A, Messina J, Enkemann S, Yeatman TJ, Sondak VK, Riker AI. Down-regulation of pro-apoptotic genes is an early event in the progression of malignant melanoma. *Ann Surg Oncol*. 2007 Apr;14(4):1416-23.

Jia D, Jurkowska RZ, Zhang X, Jeltsch A, Cheng X. Structure of Dnmt3a bound to Dnmt3L suggests a model for de novo DNA methylation. *Nature*. 2007 Sep 13;449(7159):248-51.

Jjingo D, Conley AB, Yi SV, Lunyak VV, Jordan IK. On the presence and role of human gene-body DNA methylation. *Oncotarget*. 2012 Apr;3(4):462-74.

Jones PA Functions of ADN methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet*. 2012 May 29;13(7):484-92

Jones PA, Archer TK, Baylin SB, Beck S, Berger S, Bernstein BE, Carpten JD, Clark SJ, Costello JF, Doerge RW, Esteller M, Feinberg AP, Gingeras TR, Greally JM, Henikoff S, Herman JG, Jackson-Grusby L, Jenuwein T, Jirtle RL, Kim YJ, Laird PW, Lim B, Martienssen R, Polyak K, Stunnenberg H, Tlsty TD, Tycko B, Ushijima T, Zhu J, Pirrotta V, Allis CD, Elgin SC, Jones PA, Martienssen R, Rine J, Wu C. Moving AHEAD with an international human epigenome project. *Nature*. 2008 Aug 7;454(7205):711-5

Jones PA, Taylor SM. Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell*. 1980 May;20(1):85-93.

Jones PA. The DNA methylation paradox. *Trends Genet*. 1999 Jan;15(1):34-77

Juergens RA, Wrangle J, Vendetti FP, Murphy SC, Zhao M, Coleman B, Sebree R, Rodgers K, Hooker CM, Franco N, Lee B, Tsai S, Delgado IE, Rudek MA, Belinsky SA, Herman JG, Baylin SB, Brock MV, Rudin CM. Combination epigenetic therapy has efficacy in patients with refractory advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Discov*. 2011 Dec;1(7):598-607.

Kaneda A, Feinberg AP. Loss of imprinting of IGF2: a common epigenetic modifier of intestinal tumor risk. *Cancer Res*. 2005 Dec 15;65(24):11236-40.

Kapoor A, Goldberg MS, Cumberland LK, Ratnakumar K, Segura MF, Emanuel PO, Menendez S, Vardabasso C, Leroy G, Vidal CI, Polsky D, Osman I, Garcia BA, Hernando E, Bernstein E. The histone variant macroH2A suppresses melanoma progression through regulation of CDK8. *Nature*. 2010 Dec 23;468(7327):1105-9. doi: 10.1038/nature09590.

Karjalainen JM, Kellokoski JK, Eskelinen MJ, Alhava EM, Kosma VM. Downregulation of transcription factor AP-2 predicts poor survival in stage I cutaneous malignant melanoma. *J Clin Oncol*. 1998 Nov;16(11):3584-91

Kashima T, Nakamura K, Kawaguchi J, Takanashi M, Ishida T, Aburatani H, Kudo A, Fukayama M, Grigoriadis AE. Overexpression of cadherins suppresses pulmonary metastasis of osteosarcoma in vivo. *Int J Cancer*. 2003 Mar 20;104(2):147-54.

Kawaguchi J, Takeshita S, Kashima T, Imai T, Machinami R, Kudo A. Expression and function of the splice variant of the human cadherin-11 gene in subordination to intact cadherin-11. *J Bone Miner Res*. 1999 May;14(5):764-75.

Keshet I, Schlesinger Y, Farkash S, et al. Evidence for an instructive mechanism of de novo methylation in cancer cells. *Nature genetics* 2006;38(2):149-53

Kim S, Takahashi H, Lin WW, Descargues P, Grivennikov S, Kim Y, Luo JL, Karin M. Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis. *Nature*. 2009 Jan 1;457(7225):102-6.

Kirschbaum M, Frankel P, Popplewell L, Zain J, Delioukina M, Pullarkat V, Matsuoka D, Pulone B, Rotter AJ, Espinoza-Delgado I, Nademanee A, Forman SJ, Gandara D, Newman E. Phase II study of vorinostat for treatment of relapsed or refractory indolent non-Hodgkin's lymphoma and mantle cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2011 Mar 20;29(9):1198-203.

Klose RJ, Bird AP. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci*. 2006 Feb;31(2):89-97.

Koga Y, Pelizzola M, Cheng E, Krauthammer M, Sznol M, Ariyan S, Narayan D, Molinaro AM, Halaban R, Weissman SM. Genome-wide screen of promoter methylation identifies novel markers in melanoma. *Genome Res*. 2009 Aug;19(8):1462-70.

Koh KP, Yabuuchi A, Rao S, Huang Y, Cuniff K, Nardone J, Laiho A, Tahiliani M, Sommer CA, Mostoslavsky G, Lahesmaa R, Orkin SH, Rodig SJ, Daley GQ, Rao

A.Tet1 and Tet2 regulate 5-hydroxymethylcytosine production and cell lineage specification in mouse embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2011 Feb 4;8(2):200-13.

Koizariades T. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 2007 Feb 23;128(4):693-705

Konishi K, Watanabe Y, Shen L, Guo Y, Castoro RJ, Kondo K, Chung W, Ahmed S, Jelinek J, Bumber YA, Estecio MR, Maegawa S, Kondo Y, Itoh F, Imawari M, Hamilton SR, Issa JP. DNA methylation profiles of primary colorectal carcinoma and matched liver metastasis. *PLoS One*. 2011;6(11):e27889

Koralov SB, Muljo SA, Galler GR, Krek A, Chakraborty T, Kanellopoulou C, Jensen K, Cobb BS, Merkenschlager M, Rajewsky N, Rajewsky K. Dicer ablation affects antibody diversity and cell survival in the B lymphocyte lineage. *Cell*. 2008 Mar 7;132(5):860-74. doi: 10.1016/j.cell.2008.02.020.

Kouzarides T. Histone methylation in transcriptional control. *Curr Opin Genet Dev*. 2002 Apr;12(2):198-209.

Kulis M, Heath S, Bibikova M, Queirós AC, Navarro A, Clot G, Martínez-Trillos A, Castellano G, Brun-Heath I, Pinyol M, Barberán-Soler S, Papasaikas P, Jares P, Beà S, Rico D, Ecker S, Rubio M, Royo R, Ho V, Klotzle B, Hernández L, Conde L, López-Guerra M, Colomer D, Villamor N, Aymerich M, Rozman M, Bayes M, Gut M, Gelpí JL, Orozco M, Fan JB, Quesada V, Puente XS, Pisano DG, Valencia A, López-Guillermo A, Gut I, López-Otín C, Campo E, Martín-Subero JI. Epigenomic analysis detects widespread gene-body DNA hypomethylation in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet*. 2012 Nov;44(11):1236-42.

Laurent L, Wong E, Li G, Huynh T, Tsigos A, Ong CT, Low HM, Kin Sung KW, Rigoutsos I, Loring J, Wei CL. Dynamic changes in the human methylome during differentiation. *Genome Res*. 2010 Mar;20(3):320-31.

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993 Dec 3;75(5):843-54

Lewin J, Plum A, Hildmann T, Rujan T, Eckhardt F, Liebenberg V, Lofton-Day C, Wasserkort R. Comparative DNA methylation analysis in normal and tumour tissues and in cancer cell lines using differential methylation hybridisation. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(7-8):1539-50.

- Lewin J, Plum A, Hildmann T, Rujan T, Eckhardt F, Liebenberg V, Lofton-Day C, Wasserkort R. Comparative DNA methylation analysis in normal and tumour tissues and in cancer cell lines using differential methylation hybridisation. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(7-8):1539-50
- Li L, Liu Y. Diverse small non-coding RNAs in RNA interference pathways. *Methods Mol Biol.* 2011;764:169-82.
- Li Z, Zhou Z, Donahue HJ. Alterations in Cx43 and OB-cadherin affect breast cancer cell metastatic potential. *Clin Exp Metastasis.* 2008;25(3):265-72.
- Lind GE, Kleivi K, Meling GI, et al. ADAMTS1, CRABP1, and NR3C1 identified as epigenetically deregulated genes in colorectal tumorigenesis. *Cell Oncol* 2006;28(5-6):259-72.
- Liu CY, Chao TK, Su PH, Lee HY, Shih YL, Su HY, Chu TY, Yu MH, Lin YW, Lai HC. Characterization of LMX-1A as a metastasis suppressor in cervical cancer. *J Pathol.* 2009 Oct;219(2):222-31
- Liu S, Ren S, Howell P, Fodstad O, Riker AI. Identification of novel epigenetically modified genes in human melanoma via promoter methylation gene profiling. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2008 Oct;21(5):545-58
- Lopez-Serra L, Ballestar E, Ropero S, Setien F, Billard LM, Fraga MF, Lopez-Nieva P, Alaminos M, Guerrero D, Dante R, Esteller M. Unmasking of epigenetically silenced candidate tumor suppressor genes by removal of methyl-CpG-binding domain proteins. *Oncogene.* 2008 Jun 5;27(25):3556-66.
- Lopez-Serra L, Esteller M. Proteins that bind methylated DNA and human cancer: reading the wrong words. *Br J Cancer.* 2008 Jun 17;98(12):1881-5.
- Lujambio A, Calin GA, Villanueva A, Ropero S, Sánchez-Céspedes M, Blanco D, Montuenga LM, Rossi S, Nicoloso MS, Faller WJ, Gallagher WM, Eccles SA, Croce CM, Esteller M. A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Sep 9;105(36):13556-61.
- Lujambio A, Esteller M. CpG island hypermethylation of tumor suppressor microRNAs in human cancer. *Cell Cycle.* 2007 Jun 15;6(12):1455-9.
- Lujambio A, Lowe SW. The microcosmos of cancer. *Nature.* 2012 Feb 15;482(7385):347-55.

Lujambio A, Ropero S, Ballestar E, et al. Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer research* 2007;67(4):1424-9

Lunyak VV, Burgess R, Prefontaine GG, Nelson C, Sze SH, Chenoweth J, Schwartz P, Pevzner PA, Glass C, Mandel G, Rosenfeld MG. Corepressor-dependent silencing of chromosomal regions encoding neuronal genes. *Science*. 2002 Nov 29;298(5599):1747-52.

Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature*. 2008 Jul 24;454(7203):436-44.

Marchong MN, Yurkowski C, Ma C, Spencer C, Pajovic S, Gallie BL. Cdh11 acts as a tumor suppressor in a murine retinoblastoma model by facilitating tumor cell death. *PLoS Genet*. 2010 Apr 22;6(4):e1000923.

McGuire WL. Current status of estrogen receptors in human breast cancer. *Cancer*. 1975 Aug;36(2):638-44.

Melo SA, Moutinho C, Ropero S, Calin GA, Rossi S, Spizzo R, Fernandez AF, Davalos V, Villanueva A, Montoya G, Yamamoto H, Schwartz S Jr, Esteller M. A genetic defect in exportin-5 traps precursor microRNAs in the nucleus of cancer cells. *Cancer Cell*. 2010 Oct 19;18(4):303-15.

Melo SA, Ropero S, Moutinho C, Aaltonen LA, Yamamoto H, Calin GA, Rossi S, Fernandez AF, Carneiro F, Oliveira C, Ferreira B, Liu CG, Villanueva A, Capella G, Schwartz S Jr, Shiekhata R, Esteller M. A TARBP2 mutation in human cancer impairs microRNA processing and DICER1 function. *Nat Genet*. 2009 Mar;41(3):365-70.

Morgan HD, Santos F, Green K, Dean W, Reik W. Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum Mol Genet*. 2005 Apr 15;14 Spec No 1:R47-58

Mori T, Kim J, Yamano T, Takeuchi H, Huang S, Umetani N, Koyanagi K, Hoon DS. Epigenetic up-regulation of C-C chemokine receptor 7 and C-X-C chemokine receptor 4 expression in melanoma cells. *Cancer Res*. 2005 Mar 1;65(5):1800-7

Mueller DW, Bosserhoff AK. MicroRNA miR-196a controls melanoma-associated genes by regulating HOX-C8 expression. *Int J Cancer*. 2011 Sep 1;129(5):1064-74.

Nakajima G, Patino-Garcia A, Bruheim S, Xi Y, San Julian M, Lecanda F, Sierrasesumaga L, Müller C, Fodstad O, Ju J. CDH11 expression is associated with

survival in patients with osteosarcoma. *Cancer Genomics Proteomics*. 2008 Jan-Feb;5(1):37-42.

Newman MA, Thomson JM, Hammond SM. Lin-28 interaction with the Let-7 precursor loop mediates regulated microRNA processing. *RNA*. 2008 Aug;14(8):1539-49.

Ohm JE, McGarvey KM, Yu X, Cheng L, Schuebel KE, Cope L, Mohammad HP, Chen W, Daniel VC, Yu W, Berman DM, Jenuwein T, Pruitt K, Sharkis SJ, Watkins DN, Herman JG, Baylin SB. A stem cell-like chromatin pattern may predispose tumor suppressor genes to DNA hypermethylation and heritable silencing. *Nat Genet*. 2007 Feb;39(2):237-42.

Onder TT, Gupta PB, Mani SA, Yang J, Lander ES, Weinberg RA. Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer Res*. 2008 May 15;68(10):3645-54.

Ooi SK, Qiu C, Bernstein E, Li K, Jia D, Yang Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Lin SP, Allis CD, Cheng X, Bestor TH. DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA. *Nature*. 2007 Aug 9;448(7154):714-7.

Pablo D. Rabinowicz, Lance E. Palmer, Bruce P. May, Michael T. Hemann, Scott W. Lowe, W. Richard McCombie, and Robert A. Martienssen. Genes and Transposons Are Differentially Methylated in Plants, but Not in Mammals. *Genome Res*. 2003 December; 13(12): 2658–2664

Paroush Z, Keshet I, Yisraeli J, Cedar H. Dynamics of demethylation and activation of the alpha-actin gene in myoblasts. *Cell*. 1990 Dec 21;63(6):1229-37.

Pasque V, Gillich A, Garrett N, Gurdon JB. Histone variant macroH2A confers resistance to nuclear reprogramming. *EMBO J*. 2011 May 6;30(12):2373-87.

Paz MF, Fraga MF, Avila S, Guo M, Pollan M, Herman JG, Esteller M. A systematic profile of DNA methylation in human cancer cell lines. *Cancer Res*. 2003 Mar 1;63(5):1114-21.

Paz MF, Wei S, Cigudosa JC, Rodriguez-Perales S, Peinado MA, Huang TH, Esteller M. Genetic unmasking of epigenetically silenced tumor suppressor genes in colon cancer cells deficient in DNA methyltransferases. *Hum Mol Genet*. 2003 Sep 1;12(17):2209-19.

Peng L, Ling H, Yuan Z, Fang B, Bloom G, Fukasawa K, Koomen J, Chen J, Lane WS, Seto E. SIRT1 negatively regulates the activities, functions, and protein levels of hMOF and TIP60. *Mol Cell Biol.* 2012 Jul;32(14):2823-36

Pfister S, Rea S, Taipale M, Mendrzyk F, Straub B, Ittrich C, Thuerigen O, Sinn HP, Akhtar A, Lichter P. The histone acetyltransferase hMOF is frequently downregulated in primary breast carcinoma and medulloblastoma and constitutes a biomarker for clinical outcome in medulloblastoma. *Int J Cancer.* 2008 Mar 15;122(6):1207-13.

Pishvaian MJ, Feltes CM, Thompson P, Bussemakers MJ, Schalken JA, Byers SW. Cadherin-11 is expressed in invasive breast cancer cell lines. *Cancer Res.* 1999 Feb 15;59(4):947-52.

Png KJ, Yoshida M, Zhang XH, Shu W, Lee H, Rimner A, Chan TA, Comen E, Andrade VP, Kim SW, King TA, Hudis CA, Norton L, Hicks J, Massagué J, Tavazoie SF. MicroRNA-335 inhibits tumor reinitiation and is silenced through genetic and epigenetic mechanisms in human breast cancer. *Genes Dev.* 2011 Feb 1;25(3):226-31

Pogribny IP, Tryndyak VP, Muskhelishvili L, Rusyn I, Ross SA. Methyl deficiency, alterations in global histone modifications, and carcinogenesis. *J Nutr.* 2007 Jan;137(1 Suppl):216S-222S.

Polo SE, Almouzni G. Chromatin assembly: a basic recipe with various flavours. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2006 16:104–11

Raisner RM, Hartley PD, Meneghini MD, Bao MZ, Liu CL. Histone variant H2A.Z marks the 5 ends of both active and inactive genes in euchromatin. *Cell* 2005 123:233–48

Rauch TA, Zhong X, Wu X, Wang M, Kernstine KH, Wang Z, Riggs AD, Pfeifer GP. High-resolution mapping of DNA hypermethylation and hypomethylation in lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Jan 8;105(1):252-7.

Razin A. CpG methylation, chromatin structure and gene silencing—a three-way connection. *EMBO J.* 1998 Sep 1;17(17):4905-8.

Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science.* 2001 Aug 10;293(5532):1089-93

Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science.* 2001 Aug 10;293(5532):1089-93

Rhee I, Bachman KE, Park BH, Jair KW, Yen RW, Schuebel KE, Cui H, Feinberg AP, Lengauer C, Kinzler KW, Baylin SB, Vogelstein B. DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells. *Nature*. 2002 Apr 4;416(6880):552-6.

Richard Z. Chen*, Ulf Pettersson*†, Caroline Beard*†, Laurie Jackson-Grusby* & Rudolf Jaenisch DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. *Nature* 1998

Riggs AD. X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenet Cell Genet*. 1975;14(1):9-25.

Rinn JL, Kertesz M, Wang JK, Squazzo SL, Xu X, Brugmann SA, Goodnough LH, Helms JA, Farnham PJ, Segal E, Chang HY. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell*. 2007 Jun 29;129(7):1311-23.

Robert MF, Morin S, Beaulieu N, Gauthier F, Chute IC, Barsalou A, MacLeod AR. DNMT1 is required to maintain CpG methylation and aberrant gene silencing in human cancer cells. *Nat Genet*. 2003 Jan;33(1):61-5

Rodenhiser DI, Andrews J, Kennette W, Sadikovic B, Mendlowitz A, Tuck AB, Chambers AF. Epigenetic mapping and functional analysis in a breast cancer metastasis model using whole-genome promoter tiling microarrays. *Breast Cancer Res*. 2008;10(4):R62.

Saito Y, Jones PA. Epigenetic activation of tumor suppressor microRNAs in human cancer cells. *Cell Cycle*. 2006 Oct;5(19):2220-2.

Salazar R, Roepman P, Capella G, Moreno V, Simon I, Dreezen C, Lopez-Doriga A, Santos C, Marijnen C, Westerga J, Bruin S, Kerr D, Kuppen P, van de Velde C, Morreau H, Van Velthuysen L, Glas AM, Van't Veer LJ, Tollenaar R. Gene expression signature to improve prognosis prediction of stage II and III colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2011 Jan 1;29(1):17-24.

Sanchez-Mut JV, Huertas D, Esteller M. Aberrant epigenetic landscape in intellectual disability. *Prog Brain Res*. 2012;197:53-71. doi: 10.1016/B978-0-444-54299-1.00004-2.

Sandoval J, Heyn H, Moran S, Serra-Musach J, Pujana MA, Bibikova M, Esteller M. Validation of a DNA methylation microarray for 450,000 CpG sites in the human genome. *Epigenetics*. 2011 Jun;6(6):692-702

Schramm SJ, Campain AE, Scolyer RA, Yang YH, Mann GJ. Review and cross-validation of gene expression signatures and melanoma prognosis. *J Invest Dermatol*. 2012 Feb;132(2):274-83.

Segura MF, Belitskaya-Lévy I, Rose AE, Zakrzewski J, Gaziel A, Hanniford D, Darvishian F, Berman RS, Shapiro RL, Pavlick AC, Osman I, Hernando EM. Melanoma MicroRNA signature predicts post-recurrence survival. *Clin Cancer Res*. 2010 Mar 1;16(5):1577-86.

Serrano A, Tanzarella S, Lionello I, Mendez R, Traversari C, Ruiz-Cabello F, Garrido F. Rexpression of HLA class I antigens and restoration of antigen-specific CTL response in melanoma cells following 5-aza-2'-deoxycytidine treatment. *Int J Cancer*. 2001 Oct 15;94(2):243-51.

Silber J, Lim DA, Petritsch C, Persson AI, Maunakea AK, Yu M, Vandenberg SR, Ginzinger DG, James CD, Costello JF, Bergers G, Weiss WA, Alvarez-Buylla A, Hodgson JG. miR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells. *BMC Med*. 2008 Jun 24;6:14

Simpson VJ, Johnson TE, Hammen RF: *Caenorhabditis elegans* ADN does not contain 5-methylcytosine at any time during development or aging. *Nucleic Acids Res* 1986, 14:6711-6719

Smiraglia DJ, Rush LJ, Frühwald MC, Dai Z, Held WA, Costello JF, Lang JC, Eng C, Li B, Wright FA, Caligiuri MA, Plass C. Excessive CpG island hypermethylation in cancer cell lines versus primary human malignancies. *Hum Mol Genet*. 2001 Jun 15;10(13):1413-9.

Smiraglia DJ, Rush LJ, Frühwald MC, Dai Z, Held WA, Costello JF, Lang JC, Eng C, Li B, Wright FA, Caligiuri MA, Plass C. Excessive CpG island hypermethylation in cancer cell lines versus primary human malignancies. *Hum Mol Genet*. 2001 Jun 15;10(13):1413-9.

Smith AP, Hoek K, Becker D. Whole-genome expression profiling of the melanoma progression pathway reveals marked molecular differences between nevi/melanoma in situ and advanced-stage melanomas. *Cancer Biol Ther*. 2005 Sep;4(9):1018-29.

Spicer JD, McDonald B, Cools-Lartigue JJ, Chow SC, Giannias B, Kubes P, Ferri LE. Neutrophils promote liver metastasis via Mac-1-mediated interactions with circulating tumor cells. *Cancer Res*. 2012 Aug 15;72(16):3919-27.

Stathis A, Hotte SJ, Chen EX, Hirte HW, Oza AM, Moretto P, Webster S, Laughlin A, Stayner LA, McGill S, Wang L, Zhang WJ, Espinoza-Delgado I, Holleran JL, Egorin MJ, Siu LL. Phase I study of decitabine in combination with vorinostat in patients with advanced solid tumors and non-Hodgkin's lymphomas. *Clin Cancer Res*. 2011 Mar 15;17(6):1582-90.

Sterner DE, Berger SL. Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2000 Jun;64(2):435-59

Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature*. 2000 Jan 6;403(6765):41-5.

Straussman R, Nejman D, Roberts D, Steinfeld I, Blum B, Benvenisty N, Simon I, Yakhini Z, Cedar H. Developmental programming of CpG island methylation profiles in the human genome. *Nat Struct Mol Biol*. 2009 May;16(5):564-71

Strohner R, Wachsmuth M, Dachauer K, Mazurkiewicz J, Hochstatter J, Rippe K, Längst G. A 'loop recapture' mechanism for ACF-dependent nucleosome remodeling. *Nat Struct Mol Biol*. 2005 Aug;12(8):683-90. Epub 2005 Jul 17.

Suzuki H, Gabrielson E, Chen W, et al. A genomic screen for genes upregulated by demethylation and histone deacetylase inhibition in human colorectal cancer. *Nature genetics* 2002;31(2):141-9.

Suzuki H, Igarashi S, Nojima M, Maruyama R, Yamamoto E, Kai M, Akashi H, Watanabe Y, Yamamoto H, Sasaki Y, Itoh F, Imai K, Sugai T, Shen L, Issa JP, Shinomura Y, Tokino T, Toyota M. IGFBP7 is a p53-responsive gene specifically silenced in colorectal cancer with CpG island methylator phenotype. *Carcinogenesis*. 2010 Mar;31(3):342-9.

Szwagierczak A, Bultmann S, Schmidt CS, Spada F, Leonhardt H. Sensitive enzymatic quantification of 5-hydroxymethylcytosine in genomic DNA. *Nucleic Acids Res*. 2010 Oct;38(19):e181.

Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, Agarwal S, Iyer LM, Liu DR, Aravind L, Rao A. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*. 2009 May 15;324(5929):930-5

Urnov FD, Wolffe AP. Above and within the genome: epigenetics past and present. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2001 Apr;6(2):153-67.

Van Marck V, Stove C, Jacobs K, Van den Eynden G, Bracke M. P-cadherin in adhesion and invasion: opposite roles in colon and bladder carcinoma. *Int J Cancer*. 2011 Mar 1;128(5):1031-44.

Van Speybroeck L. From epigenesis to epigenetics: the case of C. H. Waddington. *Ann N Y Acad Sci*. 2002 Dec;981:61-81

Ventura A, Young AG, Winslow MM, Lintault L, Meissner A, Erkeland SJ, Newman J, Bronson RT, Crowley D, Stone JR, Jaenisch R, Sharp PA, Jacks T.. Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. *Cell*. 2008 Mar 7;132(5):875-86. doi: 10.1016/j.cell.2008.02.019.

Viswanathan SR, Daley GQ, Gregory RI. Selective blockade of microRNA processing by Lin28. *Science*. 2008 Apr 4;320(5872):97-100

Waalwijk C, Flavell RA. MspI, an isoschizomer of HpaII which cleaves both unmethylated and methylated HpaII sites. *Nucleic Acids Res*. 1978 Sep;5(9):3231-6.

Waddington CH Selection of the genetic basis for an acquired character. *Nature*. 1952 Feb 16;169(4294):278

Weber M, Davies JJ, Wittig D, et al. Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nature genetics* 2005;37(8):853-62.

Widschwendter M, Fiegl H, Egle D, Mueller-Holzner E, Spizzo G, Marth C, Weisenberger DJ, Campan M, Young J, Jacobs I, Laird PW. Epigenetic stem cell signature in cancer. *Nat Genet*. 2007 Feb;39(2):157-8.

Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS, Wright G, Davis RE, Henrickson SE, Zhao H, Ibbotson RE, Orchard JA, Davis Z, Stetler-Stevenson M, Raffeld M, Arthur DC, Marti GE, Wilson WH, Hamblin TJ, Oscier DG, Staudt LM. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood*. 2003 Jun 15;101(12):4944-51

Winnepeninckx V, Lazar V, Michiels S, Dessen P, Stas M, Alonso SR, Avril MF, Ortiz Romero PL, Robert T, Balacescu O, Eggermont AM, Lenoir G, Sarasin A, Tursz T, van den Oord JJ, Spatz A. Gene expression profiling of primary cutaneous melanoma and clinical outcome. *J Natl Cancer Inst*. 2006 Apr 5;98(7):472-82.

Wysocka J, Allis CD, Coonrod S. Histone arginine methylation and its dynamic regulation. *Front Biosci.* 2006 Jan 1;11:344-55.

Wysocka J, Swigut T, Xiao H, Milne TA, Kwon SY. A PHD finger of NURF couples histone H3 lysine 4 trimethylation with chromatin remodelling. *Nature* 2006 442:86–90

Yamashita K, Park HL, Kim MS, et al. PGP9.5 methylation in diffuse-type gastric cancer. *Cancer research* 2006;66(7):3921-7.

Yamashita K, Upadhyay S, Osada M, et al. Pharmacologic unmasking of epigenetically silenced tumor suppressor genes in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer cell* 2002;2(6):485-95.

Yoon HG, Chan DW, Reynolds AB, Qin J, Wong J. N-CoR mediates DNA methylation-dependent repression through a methyl CpG binding protein Kaiso. *Mol Cell.* 2003 Sep;12(3):723-34.

Yoshiura K, Kanai Y, Ochiai A, Shimoyama Y, Sugimura T, Hirohashi S. Silencing of the E-cadherin invasion-suppressor gene by CpG methylation in human carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Aug 1;92(16):7416-9.

Yu J, Bulk E, Ji P, Hascher A, Tang M, Metzger R, Marra A, Serve H, Berdel WE, Wiewroth R, Koschmieder S, Müller-Tidow C. The EPHB6 receptor tyrosine kinase is a metastasis suppressor that is frequently silenced by promoter DNA hypermethylation in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2010 Apr 15;16(8):2275-83.

Zhang X, Yazaki J, Sundaresan A, Cokus S, Chan SW, Chen H, Henderson IR, Shinn P, Pellegrini M, Jacobsen SE, Ecker JR.. Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of ADN methylation in arabidopsis. *Cell.* 2006 Sep 22;126(6):1189-201.

Zhang Y, Smith CL, Saha A, Grill SW, Mihardja S, Smith SB, Cairns BR, Peterson CL, Bustamante C. DNA translocation and loop formation mechanism of chromatin remodeling by SWI/SNF and RSC. *Mol Cell.* 2006 Nov 17;24(4):559-68.

Zippo A, Serafini R, Rocchigiani M, Pennacchini S, Krepelova A, Oliviero S. Histone crosstalk between H3S10ph and H4K16ac generates a histone code that mediates transcription elongation. *Cell.* 2009 Sep 18;138(6):1122-36.

ANEXO 1. Material suplementario

Parámetros	Nevi benignos		Melanomas primarios		Melanomas metastásicos	
	No. Pacientes	%	No. Pacientes	%	No. Pacientes	%
Género						
Hombre	9	64.2	17	51.5	9	37.5
Mujer	5	35.7	16	48.5	15	62.5
Edad media (años)	20.6 (1-74)		62.1 (34-84)		60.8 (31-89)	
≤50 años	12	85.7	10	30.3	8	33.3
≥50 años	2	14.3	23	69.7	16	66.7
Profundidad Breslow						
0.01–1.0	3	21.4	5	15.2	0	0
1.01-2.0	8	57.1	8	24.2	6	31.6
2.01-4.0	2	14.3	10	30.3	9	47.4
> 4.0	1	7.1	10	30.3	4	21.1
Nivel Clark						
I-II-III	NA		3	9.1	2	9.5
IV-V	NA		30	90.9	19	90.5
Ulceración						
Ausente	NA		19	57.6	8	47.1
Presente	NA		14	42.4	9	52.9
Localización						
Cabeza y cuello	3		5	15.6	2	10.5
Tronco	8		11	34.4	4	21
Extremidad superior	2		2	6.3	0	0
Extremidad inferior	1		14	43.8	13	68.4

Tabla s1: Características de los pacientes incluidos en la fase de descubrimiento en el estudio de alteraciones de metilación del ADN en la progresión del melanoma cutáneo.

Dirección	Secuencia	Longitud	Temperatura (°C)	Detección
Forward	GTTTTGAGGGAGTCGGAGC	19 bp	Tm=63.9	Metilado
Reverse	AAACTACGAAAACCGACCCC	20 bp	Tm=63.7	
Forward	GAGTTTTGAGGGAGTTGGAGT	21 bp	Tm=61.1	No metilado
Reverse	AAAACTACAAAAACCAACCCC	22 bp	Tm=61.4	

Tabla s2: Cebadores para PCR específica de metilación (MSP) empleados en el estudio de la metilación del ADN en el promotor de *CDH11*.

TFAP2B	Id	Sequence	Nt	Tm, °C	%GC
	F1	GTTGTATATAGTAGTTTTGGATTAAAGAT	30	56.2	23.3
	R1	CCTTTCCCATCCCCTCTATT	20	60.3	50
	S1	TGTTTTAGGYGTAGAGATTT	20	40.2	30
HOXA9	Id	Sequence	Nt	Tm, °C	%GC
	F1	AGGGTTTTAGTGGTGGTTAT	20	58.4	40
	R1	CACAATTAACAAACCCCATC	22	56.1	36.4
	S1	GGGGAAGTATAGTTATTTAATAAG	24	45.6	29.2
AKT3	Id	Sequence	Nt	Tm, °C	%GC
	F1	AGTAAAGTAAAATTTAAAAGGTTTAAGTG	30	56.8	20
	R1	ATATATTTAACAACTACCCAATAT	26	55.5	23.1
	S1	ATATTTGATAATATAAATGGTTAGG	25	43.7	20
NASS1*	Id	Sequence	Nt	Tm, °C	%GC
	F1	GTAGTTTTTGGYGAGTAGGAGTGTG	25	58.4	44
	R1	AACAAAACCTACAACAATTAACCTAAAA	29	58.1	20.7
	S1	GAGTGTGGYGATTTTGGA	18	42.7	44.4
JMT1*	Id	Sequence	Nt	Tm, °C	%GC
	F1	GGGAATGGyGGGGAGTTTTAGT	22	59.5	50
	R1	ATTCACAAATRCCTCTAAACAACACACTC	29	58.8	37.9
	S1	GAATTTyGGATTTTTGTAAGGTTAG	25	44.3	28
ABM1*	Id	Sequence	Nt	Tm, °C	%GC
	F1	AGGGTTTTGAAGTTGTTATTTGTTT	25	59.4	28
	R1	ACATACTATTCTCCTACTCAT	23	58.1	34.8
	S1	GTTTTGAAGTTGTTATTTGTTTG	23	45.7	26.1

(* nombres codificados debido a procesos de confidencialidad)

Tabla s3: Cebadores de pirosecuenciación empleados en la validación de marcadores de metilación de ADN implicados en la progresión del melanoma cutáneo.

Dirección	Secuencia	Longitud	Temperatura	Gen
Forward	CCTGGGGAGGAAGTAGGAAG	20	60	CDH11
Reverse	GAAAGGGCCATTGCTGATAA	20	60	
Forward	ATGGTCAACCCACCGTGT	19	60	PPIA
Reverse	TCTGCTGTCTTTGGGACCTTG	21	60	
Forward	TGACACTGGCAAACAATGCA	21	60	HPRT1
Reverse	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT	21	60	
Forward	GTAACCCGTTGAACCCATT	20	60	18s
Reverse	CCATCCAATCGGTAGTAGCG	20	60	

Tabla s4: Cebadores de RTPCR empleados para cuantificar la expresión génica de *CDH11*, frente a los normalizadores endógenos *PPIA*, *HPRT1* Y *18s*.

Término asociado	%	PValue	Fold Enrichment	Fisher-correction
GO:0048660~regulation of smooth muscle cell proliferation	7.89	0.01	25.95	2.40E-04
GO:0042127~regulation of cell proliferation	18.42	0.01	3.54	2.20E-04
GO:0008285~negative regulation of cell proliferation	13.16	0.01	5.51	2.20E-04
GO:0060538~skeletal muscle organ development	7.89	0.01	18.09	5.50E-04
GO:0007519~skeletal muscle tissue development	7.89	0.01	18.09	6.00E-04
GO:0006916~anti-apoptosis	10.53	0.01	7.73	6.00E-04
GO:0007517~muscle organ development	10.53	0.01	7.54	6.30E-04
GO:0009991~response to extracellular stimulus	10.53	0.02	7.23	1.00E-03
GO:0048584~positive regulation of response to stimulus	10.53	0.02	6.74	1.40E-03
GO:0050691~regulation of defense response to virus by host	5.26	0.02	88.42	1.40E-03
GO:0001954~positive regulation of cell-matrix adhesion	5.26	0.02	88.42	1.40E-03
GO:0048662~negative regulation of smooth muscle cell proliferation	5.26	0.03	56.84	1.70E-03
GO:0014706~striated muscle tissue development	7.89	0.03	10.03	1.80E-03
GO:0006957~complement activation, alternative pathway	5.26	0.04	53.05	1.90E-03
GO:0060537~muscle tissue development	7.89	0.04	9.55	2.10E-03
GO:0001501~skeletal system development	10.53	0.04	4.99	2.20E-03
GO:0050688~regulation of defense response to virus	5.26	0.05	41.88	2.40E-03

Tabla s5: Análisis de ontología génica con las listas individuales de genes diferencialmente metilados en las líneas pareadas de melanoma y cáncer de cabeza y cuello. Los términos asociados corresponden a procesos biológicos afectados por hipermetilación del ADN de distintos genes que convergen en procesos comunes al proceso de metástasis.

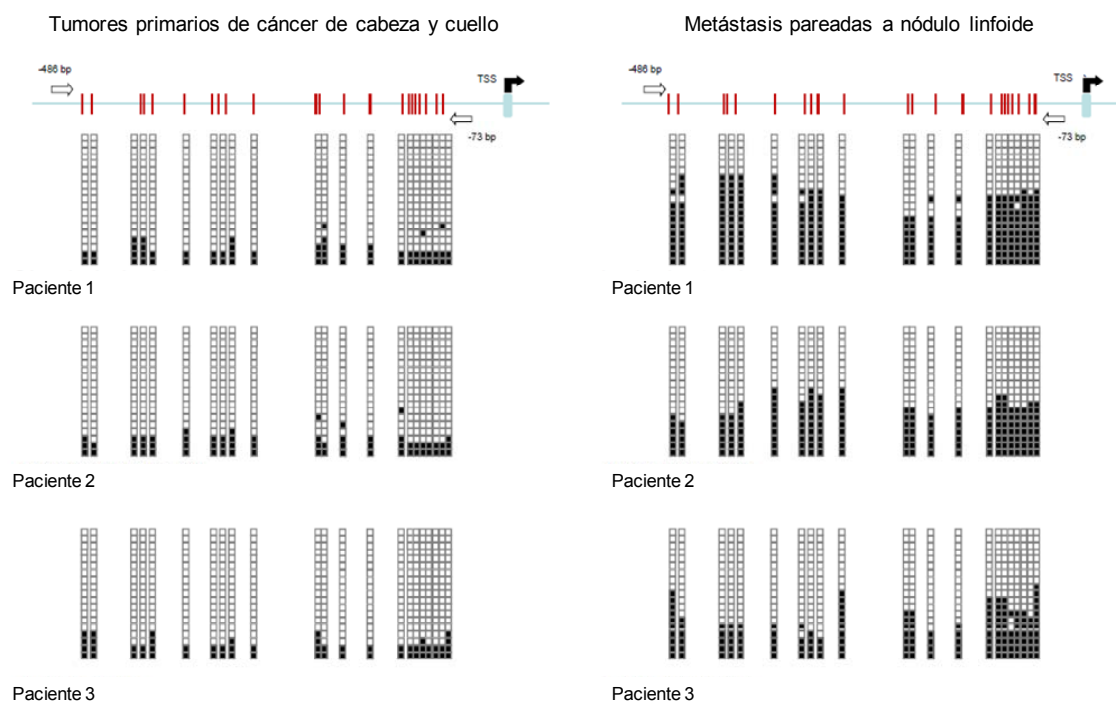


Figura s1: Secuenciación genómica de bisulfito en tumores primarios y metástasis pareadas a nódulo linfoide de pacientes de cáncer de cabeza y cuello. La presencia de clones metilados en el tumor primario, y el aumento de la población de clones con metilación de *CDH11* en la metástasis, sugiere que estas poblaciones con *CDH11* silenciado en el tumor primario podrían ser las fundadoras de los focos metastásicos.

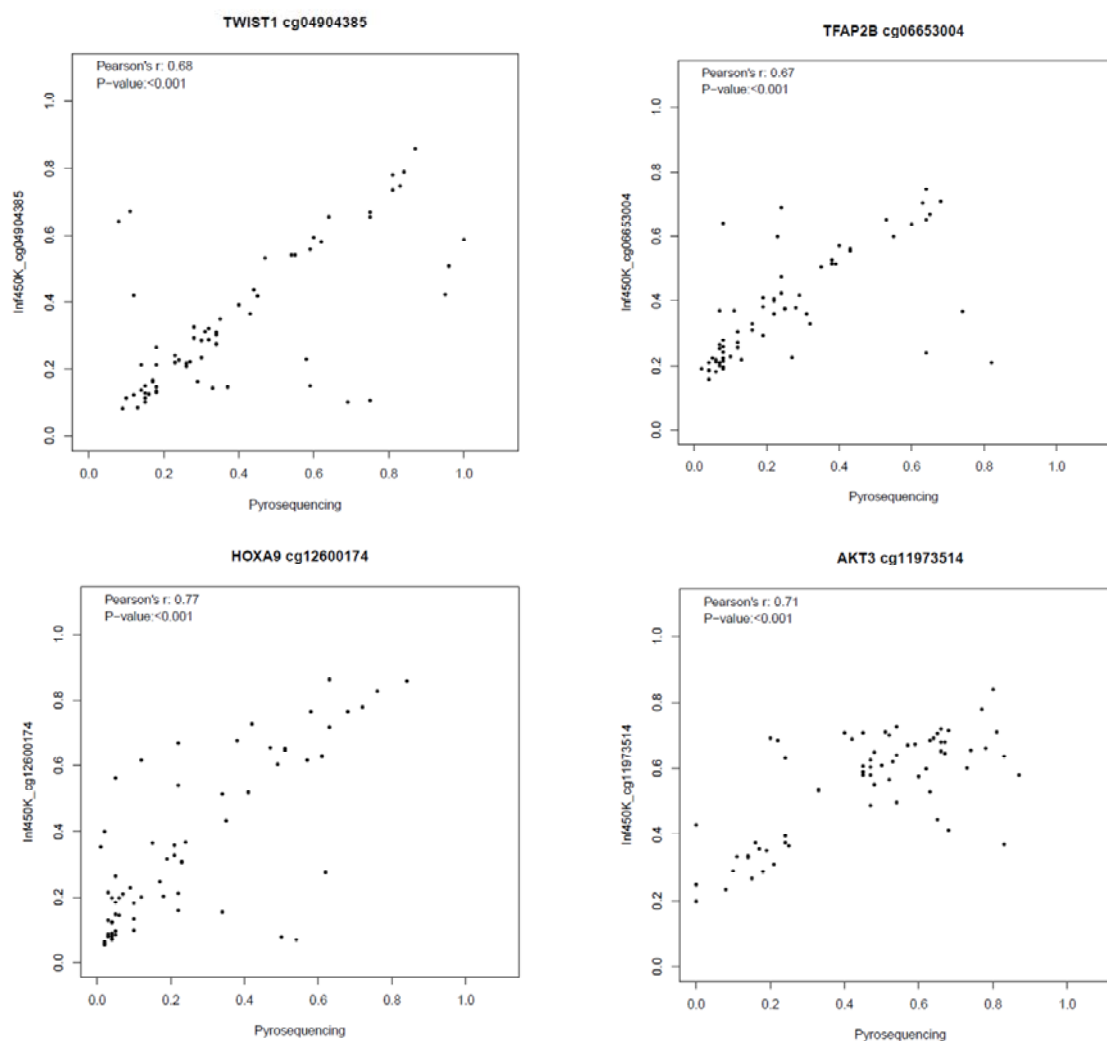


Figura s2: Valores de correlación entre los datos del array de metilación Infinium 450K, y la validación llevada a cabo por pirosecuenciación, para los cuatro marcadores de progresión tumoral. Cada gráfica corresponde a uno de los marcadores. Al lado del nombre del gen figura el identificador de la sonda del array que se ha pirosecuenciado. Los valores de metilación del array están representados en el eje de ordenadas, mientras que los resultados de pirosecuenciación en el eje de abcisas. Cada punto representa la intersección entre ambas técnicas. El coeficiente de correlación de Pearson y la significancia estadística asociada indica el grado de coincidencia entre ambas técnicas.

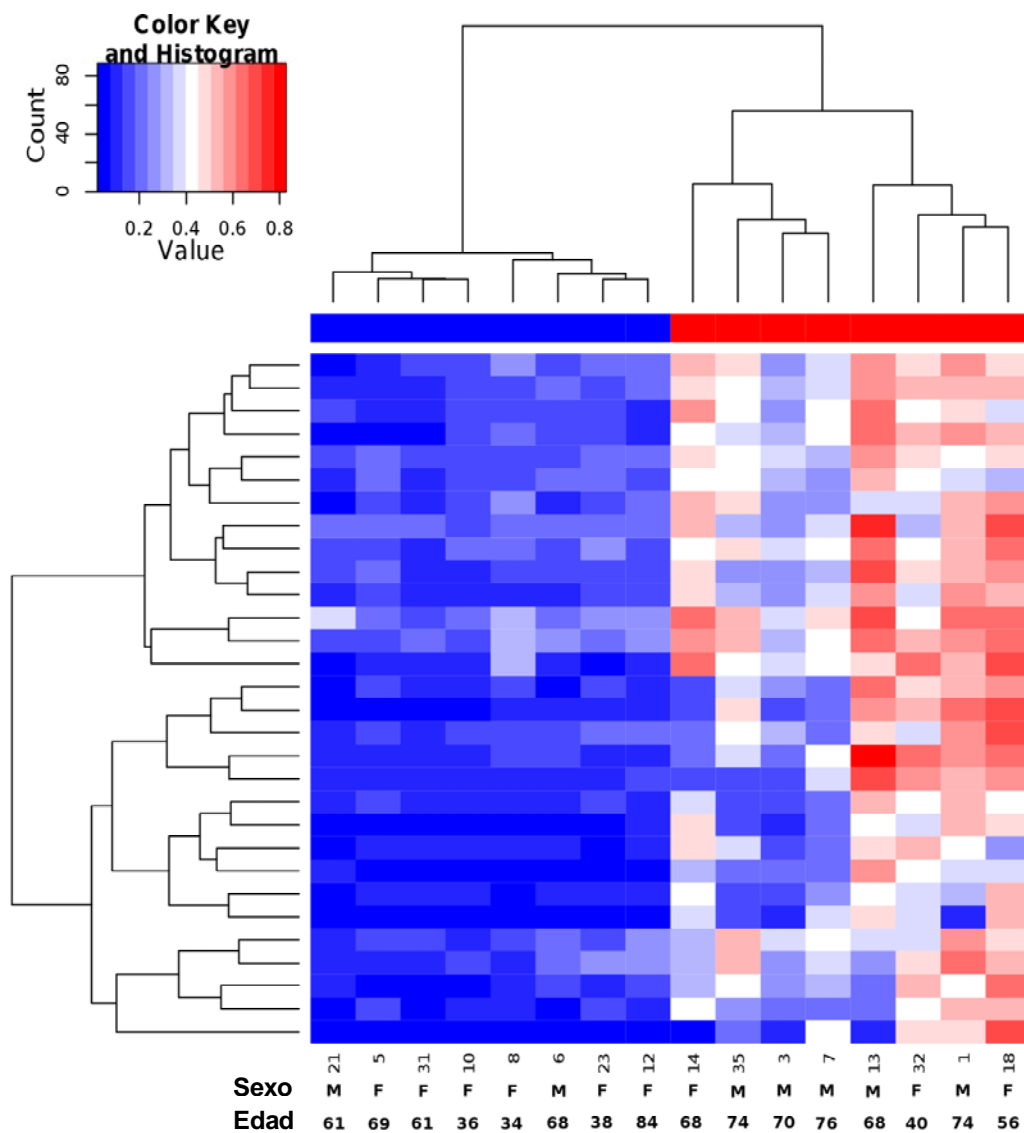


Figura s3: Perfiles de metilación del ADN atendiendo a supervivencia de los pacientes. Mediante un análisis supervisado se identificaron las sondas de metilación con mayor poder discriminatorio entre los tumores primarios de pacientes con supervivencia superior o inferior a cuatro años. Ambos grupos están compensados en las variables de sexo y edad. Entre estas sondas, se seleccionaron las de mayor diferencia de metilación para una posterior etapa de validación independiente.

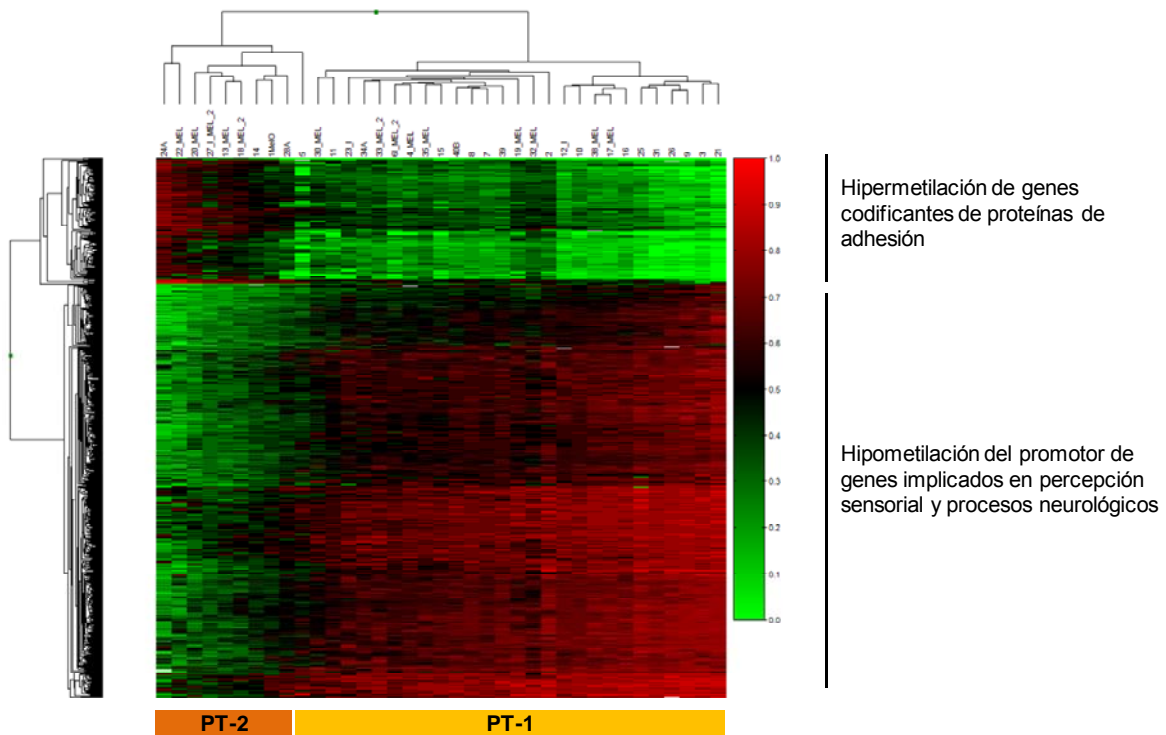


Figura s4: Perfiles de metilación del ADN en promotores de los genes diferencialmente metilados en los tumores primarios en base al índice Breslow. Los agrupados en PT-1 tienen en su mayoría un índice Breslow inferior a 3,5, mientras que los de PT-2, superior. Los genes identificados entre ambos estadíos constituyen cambios de metilación en fases avanzadas de la progresión de melanoma. La selección de sondas se hizo en base a diferencias estadísticamente significativas (Kruskal-Wallis $p < 0.01$), de valores medios de metilación entre grupos ($DM > 25\%$), y a localización en promotor génico.

ANEXO 2. Publicaciones relacionadas con el trabajo presentado en la memoria de tesis doctoral.

-Como primer autor

Carmona FJ, Villanueva A, Vidal A, Muñoz C, Puertas S, Penin RM, Gomà M, Lujambio A, Piulats JM, Mesía R, Sánchez-Céspedes M, Manós M, Condom E, Eccles SA, Esteller M. **Epigenetic Disruption of Cadherin - 11 in Human Cancer Metastasis.** *J Pathol.* 2012 Feb 28. doi: 10.1002/path.4011.

Carmona FJ*, Azuara D*, Berenguer-Llargo A*, Gernandez AF, Biondo S, de Oca J, Rodriguez-Moranta F, Salazar R, Villanueva A, Fraga MF, Guardiola J, Capellá G, Esteller M, Moreno V. **DNA methylation biomarkers for non-invasive diagnostic of Colorectal Cancer.** *Can Prev Res* 2013 (*in press*)

F. Javier Carmona and Manel Esteller. **IDIBELL Cancer Conference on Metastasis and Angiogenesis.** *Cancer Res.* 2011 Oct 1;71(19):6097-101.

Carmona FJ, Esteller M. **DNA methylation in early neoplasia.** *Cancer Biomark.* 2011;9(1-6):101-11.

F Javier Carmona and Manel Esteller. **Epigenomics of colorectal cancer.** *Mutation Research* 2009.

-Colaboraciones

Fernandez AF, Assenov Y, Martin-Subero JI, Balint B, Siebert R, Taniguchi H, Yamamoto H, Hidalgo M, Tan AC, Galm O, Ferrer I, Sanchez-Céspedes M, Villanueva A, **Carmona FJ**, Sanchez-Mut JV, Berdasco M, Moreno V, Capella G, Monk D, Ballestar E, Ropero S, Martinez

R, Sanchez-Carbayo M, Prosper F, Agirre X, Fraga MF, Graña O, Perez-Jurado L, Mora J, Puig

S, Prat J, Badimon L, Puca AA, Meltzer SJ, Lengauer T, Bridgewater J, Bock C, Esteller M. **A**

DNA methylation fingerprint of 1628 human samples. *Genome Res.* 2012 Feb;22(2):407-19.

Holger Heyn, Ning Li, Humberto J Ferreira, Sebastian Moran, David G Pisano , Antonio Gomez ,Javier Diez , Jose V Sanchez-Mut , Fernando Setien, **F Javier Carmona**, Annibale A Puca, Sergi Sayols, Miguel A Pujana, Jordi Serra-Musach, Isabel Iglesias-Plata, Francesc Formiga, Agustin F Fernandez, Mario F Fraga , Simon C Heath, Alfonso Valencia, Ivo G Gut, Jun Wang, Manel Esteller. **The Distinct DNA Methyomes of Newborns and Centenarians. Proc Natl Acad Sci U S A.** 2012 Jun 26;109(26):10522-7.

Holger Heyn, **F Javier Carmona**, Antonio Gomez, Jordana T. Bell, Sergi Sayols, Kirsten Ward, Humberto J. Ferreira, Olafur A. Stefansson, Sebastian Moran, Juan Sandoval, Jorunn E. Eyfjord, Tim D. Spector and Manel Esteller. **DNA methylation profiling in breast cancer discordant monozygotic twins identifies DOK7 as novel epigenetic biomarker. Carcinogenesis.** 2013 Jan;34(1):102-8.